

ZUR BINDUNG
KATIONISCHER, TRYPANOCIDER
WIRKSTOFFE AN
DESOXYRIBONUCLEINSÄUREN

von
Günter Minet
aus Münchberg/Ofr.

1980 #234

**ZUR BINDUNG
KATIONISCHER, TRYPANOCIDER
WIRKSTOFFE AN
DESOXYRIBONUCLEINSÄUREN**

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Günter Minet
aus Münchberg/Ofr.

Als Dissertation genehmigt
von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 20. Mai 1980

Vorsitzender der

Promotionskommission:

Professor Dr. H. Wegener

Erstberichterstatter:

Professor Dr. O. Dann

Zweitberichterstatter:

Professor Dr. W. Müller

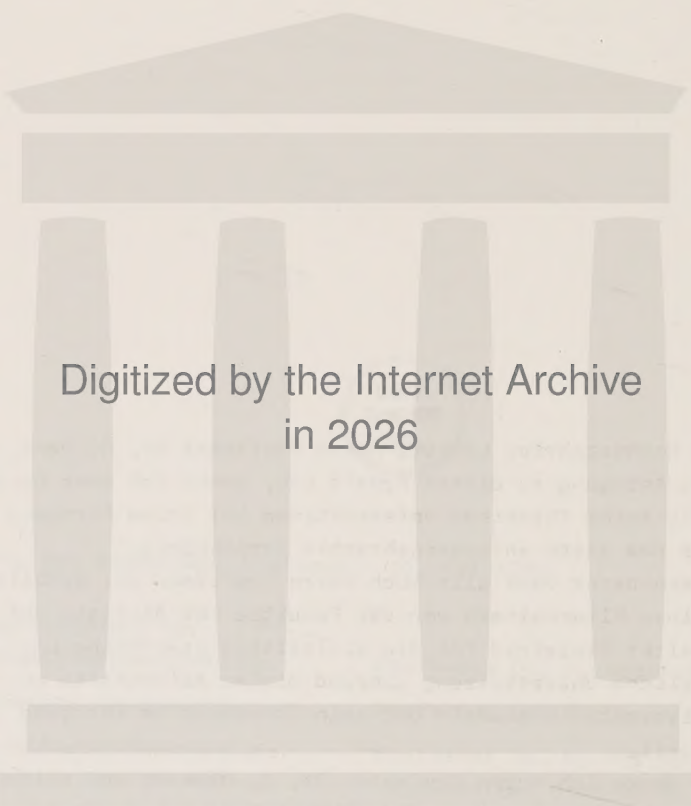
Universität Bielefeld

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1975 bis Dezember 1979 im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Angewandte Chemie, der Universität Erlangen-Nürnberg ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. O. Dann, der die Anregung zu dieser Arbeit gab, danke ich sehr herzlich für seine fördernde Unterstützung bei ihrem Fortgang und für das stets entgegengebrachte Verständnis.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. W. Müller und seinen Mitarbeitern von der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld für die vielseitige praktische und theoretische Unterstützung während dreier Aufenthalte an der Universität Bielefeld und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ferner danke ich Herrn Professor Dr. W. Heumann und seinen Mitarbeitern vom Institut für Mikrobiologie, besonders Herrn Professor Dr. A. Pühler, für viele wertvolle Ratschläge und praktische Unterstützung.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546215_0011

Inhaltsverzeichnis

Seite

Zusammenfassung.....	1
----------------------	---

A. Theoretischer Teil

1. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Untersuchungen.....	3
1.1. Zellteilungshemmende Arzneimittelnwirkungen...	3
1.1.1. Antimetabolite.....	3
1.1.2. DNA-komplexierende Substanzen.....	3
1.2. Trypanosomenfeinstruktur, Angriffspunkte und Wirkungsmechanismus trypanocider Arzneimittel	11
1.2.1. Trypanosomenfeinstruktur.....	11
1.2.2. Trypanosomen-DNA.....	13
1.2.3. Angriffspunkte und Wirkungsmechanismus kationischer trypanocider Substanzen.....	16
1.2.4. Unterschiede in der Wirksamkeit.....	20
1.3. Ausgangspunkt und Zielsetzung der eigenen Untersuchungen.....	21
2. Prokaryonten-DNA als Modell zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Interaktionen mit kationischen Liganden.....	22
2.1. Gleichgewichtsdialyse.....	22
2.1.1. Methode für gut lösliche Substanzen.....	23
2.1.2. Methoden für schwer lösliche Substanzen.....	23
2.1.3. Methode für Substanzen mit kurzweiligem Absorptionsmaximum.....	24
2.1.4. Dialyse-Membranen.....	25
2.2. Andere Bestimmungsmethoden.....	26
2.2.1. Zwei-Phasen-Verteilung.....	26
2.2.2. Gelfiltration.....	27

3.	Ergebnisse.....	28
3.1.	Spektrale Verschiebungen.....	28
3.2.	DNA-Affinitäten und Spezifitäten.....	28
3.2.1.	Grundtyp A.....	28
3.2.2.	Phenoxyerweiterungen.....	37
3.2.3.	Kohlenwasserstoff-verbrückte Strukturen.....	38
3.2.4.	Direkt kondensierte Ringsysteme.....	40
3.2.5.	Berenil-Abkömmlinge.....	41
3.2.6.	Vergleichsverbindungen.....	42
3.3.	Gleichgewichtsdialyse von DAPI und Ethidium nebeneinander.....	44
4.	Diskussion.....	46
4.1.	Spektrale Veränderungen.....	46
4.2.	Bindungsstudien.....	47
4.2.1.	DNA-Affinität.....	47
4.2.2.	DNA-Spezifität.....	48
4.2.3.	Ursachen der spezifischen Wechselwirkungen...	49
4.2.4.	AT-Spezifität im Vergleich zur Hemmwirkung auf Nucleinsäurepolymerasen.....	49
4.2.5.	Bindungsmechanismus biskationischer Liganden	51
4.2.6.	DNA-Bindung und wachstumshemmende Fähigkeiten bei pro- und eukaryontischen Mikroorganismen	53
4.2.7.	DNA-Bindung und trypanocide Aktivitäten.....	55
5.	Gleichgewichtsdialyse mit Trypanosomen-DNA...	59

B. E x p e r i m e n t e l l e r T e i l

1.	Allgemeine Angaben über Materialien.....	61
2.	Bakterien.....	62
2.1.	Aufzucht.....	62
2.2.	DNA-Isolierung.....	63
2.2.1.	Isolation von Bakterien-DNA aus B.subtilis, E.coli und Clostridienarten.....	63

2.2.2. DNA aus <i>Micrococcus luteus</i>	65
2.3. Qualitätskontrolle und Charakterisierung der DNA.....	66
2.3.1. Gehaltsbestimmung.....	66
2.3.2. Alkalische Hyperchromie.....	66
2.3.3. Überprüfung des einheitlichen Molekularge- wichts.....	66
2.3.4. Analytische Ultrazentrifugation.....	67
2.4. Gleichgewichtsdialyse.....	68
2.5. Auswertung.....	69
2.5.1. Bestimmung der DNA-Spezifität.....	69
2.5.2. Bestimmung der Bindungsaffinität.....	70
3. Arbeitsvorschriften zur Gewinnung von Trypa- nosomen-DNA.....	73
3.1. Aufzucht von Trypanosomen.....	73
3.2. Säulenchromatographische Trennung der Trypa- nosomen vom Blut des Wirts.....	74
3.3. Sicherheitsvorkehrungen zur Verhinderung von Selbstinfektionen.....	75
3.4. Isolation von Trypanosomen-DNA.....	76
3.5. Trennung der Trypanosomen-DNA in Kinetoplasten und chromosomale DNA.....	77
3.5.1. CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradient.....	77
3.5.2. Affinitätschromatographie.....	83
Anhang: Berechnungsbeispiele.....	90
Tabelle der untersuchten Substanzen.....	95
Literaturverzeichnis.....	104

Z U S A M M E N F A S S U N G

Für eine Reihe von kationischen, trypanociden Wirkstoffen wurden mittels Gleichgewichtsdialyse die Bindungsparameter an Desoxyribonucleinsäure (DNA) bestimmt. Als Modell dienten die DNAs aus *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* und *Clostridium acidurici*. Fast alle herangezogenen Substanzen zeigten sehr hohe DNA-Affinität und ausgeprägte Spezifität für Adenin-Thymin-Basenpaare (AT-Spezifität). Die Untersuchungen führten darüberhinaus zu folgenden Ergebnissen:

1. Biskationische Substanzen binden fester an DNA als Monokationen.
2. Indole zeigen generell eine höhere AT-Spezifität als die isosteren Thionaphthene und Benzofurane.
3. Zusätzliche Substituenten an den Ringsystemen verringern die Bindungsfähigkeit an DNA.

Die folgenden amidin- und imidazolinylsubstituierten Indolderivate zeigten gegenüber den anderen Verbindungen hervorragende Bindungsparameter:

- a) 2,6-Indoldiylldicarboxamidin (Nr.55) mit einem Spezifitätsparameter $\alpha = 0,10$, entsprechend 3 AT-Paaren als optimaler Bindungsstelle, und einem Affinitätsparameter $\sigma_{BS} = 6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ für *B.subtilis*-DNA;
- b) 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolylcarboxamidin (DAPI, Nr.1), mit $\alpha = 0,06$, 4 AT-Paaren, $\sigma_{BS} = 6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$;
- c) 2-[4-(4-Amidinophenoxy)phenyl]-6-indolylcarboxamidin (Nr.40) mit $\alpha = 0,05$, 4 AT-Paaren, $\sigma_{BS} = 6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$;
- d) 6,6'-Bis-(2-imidazolin-2-yl)-2,2'-biindol (Nr.28) mit $\alpha = 0,08$, 3-4 AT-Paaren, $\sigma_{BS} = 5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$;
- e) 2-[2-(4-Amidinophenyl)-6-indolyl]-6-indolylcarboxamidin (Nr.53) mit $\alpha = 0,03$, 5 AT-Paaren, $\sigma_{BS} = 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Für Verbindung Nr.1, DAPI, wurde zusätzlich das Bindungsverhalten an chromosomaler und Kinetoplasten-DNA aus *Trypanosoma rhodesiense* untersucht und gute Übereinstimmung mit den Werten bei Prokaryonten-DNA gefunden. Vergleiche der AT-Spezifität und Affinität der DNA-Bindung der untersuchten kationischen Wirkstoffe mit ihrer wachstumshemmenden Wirksamkeit bei Bakterien und Pilzen sowie bei *Trypanosoma congolense* und *Trypanosoma vivax* erlauben den Schluß, daß dem Wirkungsmechanismus der Verbindungen ein direkter Angriff auf die DNA zugrunde liegt.

A. Theoretischer Teil

1. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Untersuchungen

1.1. Zellteilungshemmende Arzneimittelwirkungen

Bei der Behandlung einer Vielzahl von Infektionskrankheiten und Neoplasmen werden Arzneimittel eingesetzt, die mit Nucleinsäuren in Wechselwirkung treten. In der Therapie von Tropenkrankheiten, wie Malaria oder Trypanosomiasen, und bei vielen Krebsformen stellen sie die wirksamsten Medikamente dar ¹⁾. Daneben haben eine Reihe von derartigen Substanzen, die keinen Eingang in die moderne Chemotherapie gefunden haben, zur Aufklärung von biochemischen Prozessen beigetragen.

1.1.1. Antimetabolite

Einen Typ von aktiven Stoffen stellen die Analoga der natürlichen Nucleinsäurebasen dar, die vor allem zur Behandlung von Tumoren und Virusinfektionen eingesetzt werden ^{2,3,4)}. Beispiele hierfür sind das Nucleotidantibiotikum Cordycepin und die Synthetika 8-Azaguanin, 6-Mercaptopurin und 5-Jod-2'-desoxyuridin, denen gemeinsam ist, daß sie anstelle der natürlichen Basen in Nucleinsäuren eingebaut werden und auf diese Weise die de-novo Synthese stören.

1.1.2. DNA-komplexierende Substanzen

Neben den Antimetaboliten gibt es eine große Anzahl von Substanzen, die hemmend auf das Wachstum von Mikroorganismen und Tumoren einwirken und deren Angriffspunkt die fertige Nucleinsäurekette ist. Diese Stoffe können ent-

weder kovalent oder reversibel mit der Nucleinsäurekette reagieren, wobei sich strukturelle Veränderungen der DNA ergeben können, wie z.B. Strangbrüche, Herauslösen von Basen oder Quervernetzung der beiden Stränge der Doppelhelix ²⁾. Substanzen, die kovalente Bindungen mit DNA eingehen, bilden irreversible Komplexe.

Das Antibiotikum Mitomycin C, ein in vitro inaktives Indolin, wird in der Zelle in ein bifunktionelles, alkylierendes und damit cytostatisches Indolderivat reduziert und schädigt in besonderem Maße GC-reiche DNA ^{2,3)} durch Quervernetzung des Doppelstranges über zwei Guaninbasen. Ähnlich können auch die Carcinostatika N-Methyl-Lost, Endoxan^R und Trenimon^R wirken ^{4,5)}.

Einzelstrangbrüche des d-Ribose-phosphat-gerüsts der DNA werden durch die Antibiotika Bleomycin und Streptonigrin erzeugt ^{2,3)}.

Die Hauptgruppe der bekannten DNA-Liganden tritt mit der DNA unter Ausbildung von relativ festen, jedoch nicht kovalenten, reversiblen Komplexen in Wechselwirkung. Dies kann durch Interkalation oder Außenanlagerung geschehen ²⁾. Hieraus resultiert eine Hemmung der RNA-Synthese, da durch die Anlagerung die Matrizenfunktion der DNA gestört ist.

Interkalierende Substanzen binden in einer spezifischen Art an DNA: Ein Teil des Liganden schiebt sich zwischen zwei benachbarte Basenpaare, so daß er parallel zu diesen in der DNA-Helix erscheint. Der eingeschobene Molekülteil ist in den meisten Fällen ein polycyclisches, planares, aromatisches Ringsystem. Die Bindung des Liganden an DNA und die Stabilität des Komplexes werden durch hydrophobe Kräfte bewirkt, dazu kommen noch elektrostatische, Dipol-induzierte-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen ¹⁾.

Die Reaktion beider Partner bedingt ein örtliches Aufwinden der DNA-Doppelhelix ^{6,7,8)}, so daß der flache Chromophor zwischen die benachbarten Basenpaare treten kann. Nach W. F u l l e r ⁸⁾ beträgt die partielle Entspiralisierung beim Einschub von 3,4 Å dicken aromatischen Chromophoren 12°. Neuere Untersuchungen haben einen Entspiralisierungswinkel von rund 24° ergeben ^{9,10,11)}.

Ob eine Substanz interkaliert oder nicht, wird mit der Bindung an zirkuläre DNA getestet (circular DNA-binding test) ¹⁾. Experimentell kann das Aufdrillen und wieder Zurückwinden der Superhelices unter dem Einfluß steigender Ligandenkonzentrationen durch die Messung der Sedimentationskoeffizienten bestimmt werden. Bei einem bestimmten kritischen Verhältnis von Ligand zu DNA liegt DNA als normaler, nicht getwisteter Ring vor, und die S_{20} nimmt einen Minimalwert an, um bei weiterer Beladung wieder anzusteigen ¹²⁾.

Zu den interkalierenden Substanzen gehören z.B. die malarawirksamen Proflavin ^{6,7)} und Chloroquin ¹³⁾, die Antitumorantibiotika Actinomycin ^{14,15,16,17)}, Tilorone ¹⁸⁾ und Daunomycin ³⁾, Lucanthone und sein Metabolit Hycanthone, beide wirksam gegen Schistosomiasis ¹⁹⁾, sowie die beiden trypanociden Verbindungen Isomethamidium ^{2,12)} und Ethidium ^{1,8,12)}.

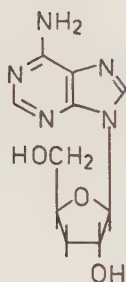
Die nicht interkalierenden Substanzen treten mit DNA nach anderen Mechanismen in Wechselwirkung, wobei sicherlich eine Anlagerung der meist stark basischen Substituenten dieser Moleküle an die anionischen Phosphatreste der DNA eine Rolle spielt.

Hierzu gehören das natürlich vorkommende Spermin ¹²⁾, das gegen Tumoren wirksame Methylglyoxal-bis(guanyldihydraton) ²⁰⁾, Streptomycin als Hemmstoff der Proteinsynthese ^{21,22)}, die antiviral wirksamen Netropsin ²³⁾,

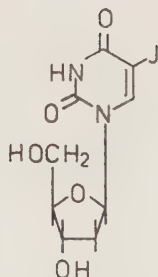
Congocidine²⁴⁾ und Distamycin²⁵⁾, sowie das gegen Trypanosomen wirksame Berenil^{R 26,27)}.

Sehr oft geht mit einer nicht interkalierenden DNA-Bindung eine bevorzugte Anlagerung der Substanzen an AT-Basenpaare einher²⁸⁾, wohingegen interkalierende Verbindungen entweder keine oder GC-Spezifität zeigen^{29,30)}.

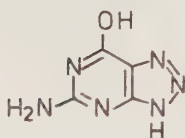
FORMELÜBERSICHT



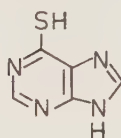
Cordycepin



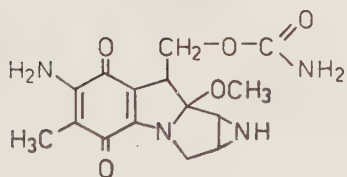
5-Jod-2'-desoxyuridin



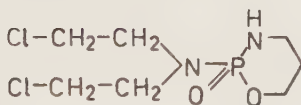
8-Azaguanin



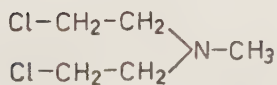
6-Mercaptopurin



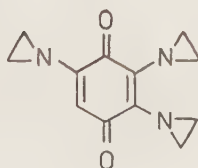
Mitomycin C



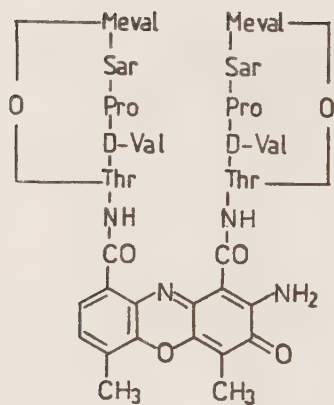
Endoxan^R



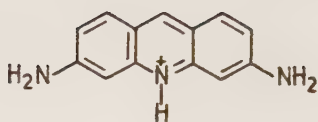
N-Methyl-Lost



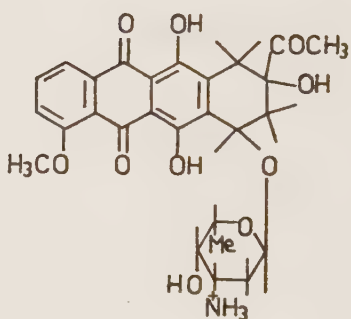
Trenimon^R



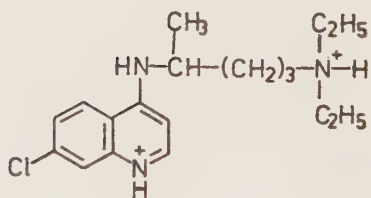
Actinomycin C₁



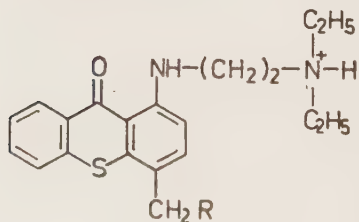
Proflavin



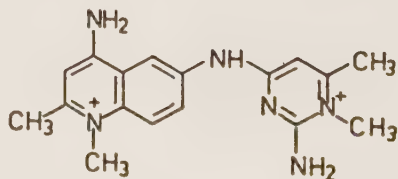
Daunomycin



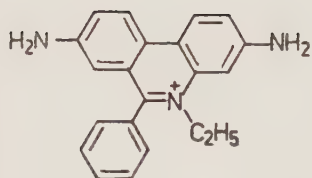
Chloroquin



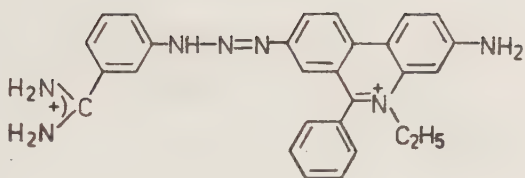
Hycanthone, R = OH ; Lucanthone , R=H



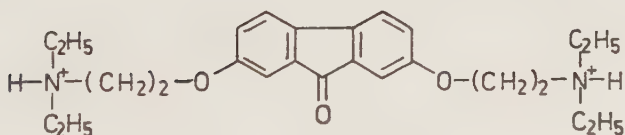
Anthracycline^R



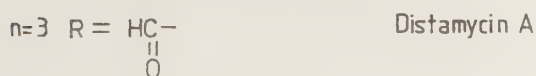
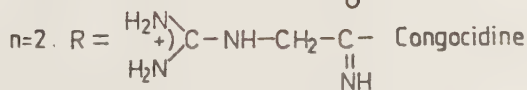
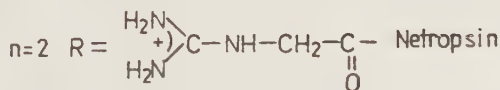
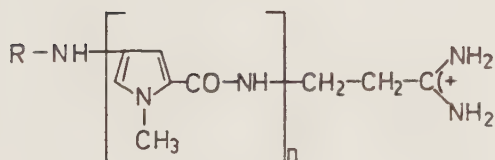
Ethidium

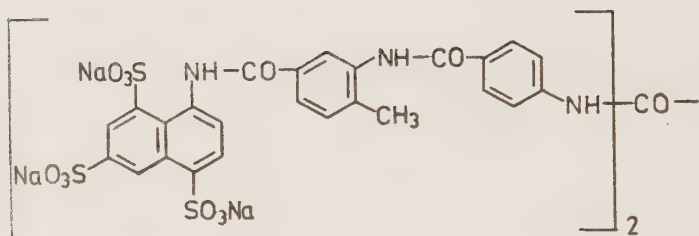


Isomethamidium

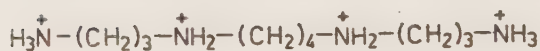


Tilorone

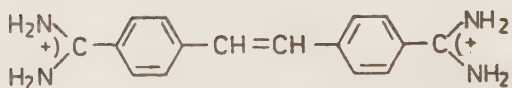




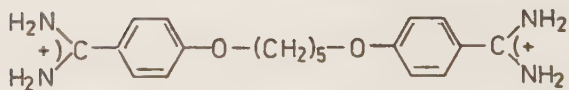
Suramin



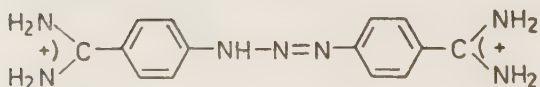
Spermin



Stilbamidin



Pentamidin



Berenil^R

1.2. Trypanosomenfeinstruktur, Angriffspunkte und Wirkungsmechanismus trypanocider Arzneimittel

1.2.1. Trypanosomenfeinstruktur

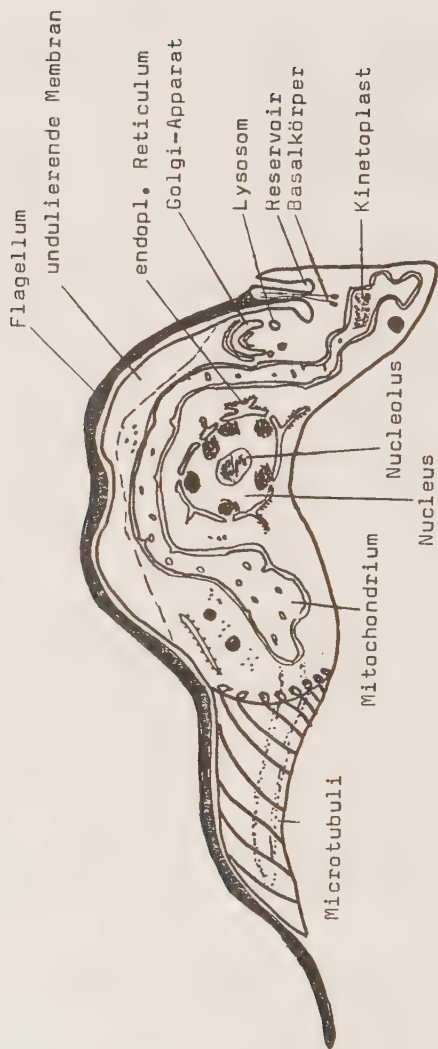
Den innerzellulären Aufbau der Trypanosomen zeigt die Abbildung Nr.1.

Sie zeigt das typische Aussehen eines infektiösen, metazyklischen Trypanosoms. Gut zu erkennen ist das Flagellum, die undulierende Membran, ein System von Mikrotubuli, die den gesamten Organismus überziehen, ferner das Mitochondrium mit dem Kinetoplasten, sowie der Zellkern. Beginnt man die Betrachtung von außen, so fällt auf, daß das Flagellum teilweise oder auch ganz mit einem Pellikel, der undulierenden Membran, verbunden ist. Am Fuß der Geißel sitzen die Basalkörper, die einerseits mit dem mikrotubulären System des Pellikels, andererseits auf bisher nicht bekannte Weise mit dem Kinetoplasten verbunden sind.

Der Kinetoplast ist ein spezieller Bezirk des Mitochondriums und besteht fast vollständig aus DNA, was durch Anfärbung im Lichtmikroskop leicht feststellbar ist. Seine Größe beträgt etwa 0.4 - 0.5 μm , während das gesamte Trypanosom etwa 20 x 1,5 μm ausmacht.

Das Mitochondrium erstreckt sich von einem Ende des Flagellats zum anderen und scheint u.a. zusammen mit den pellikulären Mikrotubuli für die mechanische Erhaltung der schlanken Form des Trypanosoms verantwortlich zu sein.

Am Fuße des Flagellums nahe den Basalkörpern befindet sich eine Stelle, die für den Stoffaustausch mit der Umgebung zuständig sein dürfte. Sie wird als Tasche oder Reservoir bezeichnet. Die anderen zellulären Bestandteile, wie Zellkern, endoplasmatisches Retikulum, Golgi-



Apparat usw. sind ähnlich wie in anderen Zellen angeordnet. Das besondere Interesse gilt also dem Mitochondrium und dem Kinetoplasten ³¹⁾.

1.2.2. Trypanosomen-DNA

Trypanosomen enthalten neben der chromosomalen DNA im Zellkern mindestens eine zweite Klasse von Desoxyribonucleinsäure im Kinetoplasten, die K-DNA, die sich insbesondere durch ihre Basenzusammensetzung von der Kern-DNA unterscheidet ^{32,33)} und mit Hilfe isopyknischer Ultrazentrifugation in Caesiumchlorid von dieser getrennt werden kann.

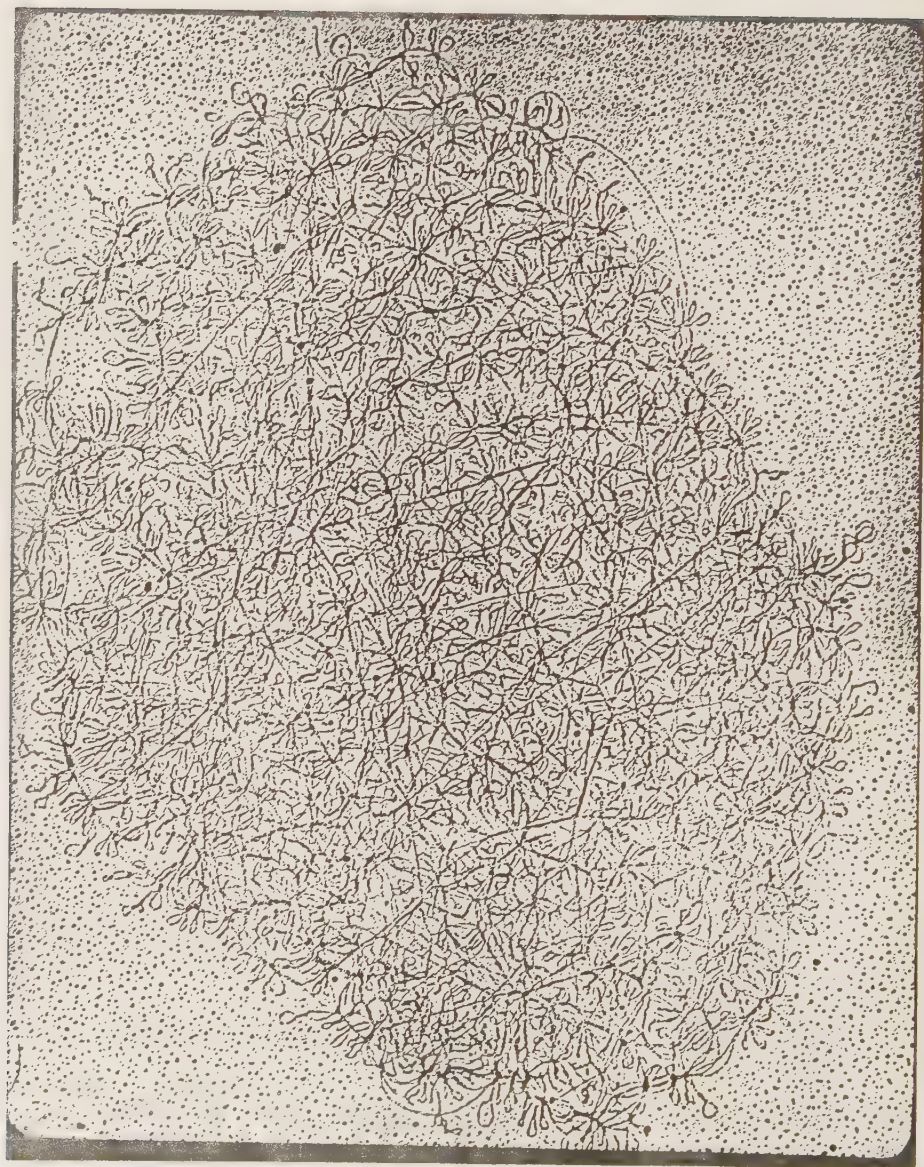
Die nachfolgende Tabelle enthält eine Zusammenstellung von einigen Trypanosomenarten, deren DNA-Zusammensetzung und Schwebedichten nach B. A. Newton ^{33,34)}:

Tabelle 1

	Satellit A	%AT	k-DNA	%AT	Satellit B	%AT	chrom. DNA	% AT	Satellit C	%AT
T.congolense	1,693	66,3	1,697	62,2			1,708	51,0		
T.brucei brucei			1,691	68,3	1,702	57,1	1,707	52,0		
T.bruc.rhodiense			1,690	69,4	1,701	58,2	1,707	52,0		
T.bruc.gambiense			1,690	69,4	1,702	57,1	1,707	52,0	1,719	39,8
T.vivax			1,696	63,3			1,713	45,9		
T.cruzi			1,698	61,2			1,709	50,0		

Die besondere DNA in dieser Gattung stellt die K-DNA dar, deren Schwebedichte zwischen 1,690 und 1,698 g·cm⁻³ schwankt. Daraus läßt sich nach S c h i l d k r a u t ³⁵⁾ der Prozentgehalt an Adenin- und Thyminbasenpaaren zu 61,2 - 69,4 % AT berechnen, wohingegen die Kern-DNA einen AT-Gehalt von etwa 50 % hat.

Da die K-DNA im Kinetoplasten lokalisiert ist, und dieser ein Bestandteil des Mitochondriums ist, liegt es nahe, in der K-DNA die mt-DNA der Flagellaten zu sehen.



Die Anfertigung dieser elektronenmikroskopischen Aufnahme
verdanke ich Herrn Dr. H.-J. Burkardt vom Institut für
Mikrobiologie

Sie liegt wie die mt-DNA zirkulär vor und ist nicht mit Histonen verbunden. In einigen Beziehungen unterscheidet sie sich jedoch erheblich von normaler mt-DNA³⁶⁾. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von K-DNA, die entweder aus lysierten Kinetoplasten oder aus der K-DNA-Fraktion des CsCl-Gradienten stammt, zeigen das gleiche Bild. Die K-DNA besteht, wie fast alle mitochondrialen DNAs, aus kovalent geschlossenen Zirkeln neben einigen langen, linearen Strukturen. Die Zirkel sind verkettet und scheinen auf den linearen Molekülen aufgereiht, so daß rosettenartig geformte Netzstrukturen entstehen^{37,38)}. Siehe Abbildung Nr.2.

Ein gravierender Unterschied zu normaler mt-DNA besteht jedoch darin, daß deren Zirkel einen Umfang von ca. 5 μm , die Minizirkel der K-DNA jedoch je nach Spezies nur von 0,2 - 0,8 μm haben³⁷⁾. Die genetische Information, die solch ein Minizirkel tragen kann, reicht sicherlich nur aus, um 2 - 3 kleine Proteine zu codieren. Da aber jeder Kinetoplast bis 2×10^{14} Minizirkel enthalten kann, stellen sie, wenn ihre Basensequenz identisch ist, eine beträchtliche Genverstärkung dar³⁸⁾.

Weitere Unterschiede zu mt-DNA bestehen in der DNA-Replikation. Anders als mt-DNA, die kontinuierlich synthetisiert wird, bildet sich die K-DNA gleichzeitig mit der Kern-DNA³⁶⁾.

Die Unterschiede zu normaler mt-DNA ließen Zweifel aufkommen, ob die Minizirkel die eigentliche mt-DNA der Trypanosomatidae darstellen.

Wesentliches zur Aufklärung trugen die Arbeiten von Kleisen, Borst, Steinert und Brack bei. So konnten Steinert und v. Assel³⁹⁾ mit Hilfe einer Schmelzanalyse zeigen, daß K-DNA in der Basenzusammensetzung heterogen ist.

B r a c k und D e l a i n ⁴⁰⁾ entdeckten durch Partialdenaturisierung der zirkulären K-DNA vier kleine AT-reiche Zonen, die den großen linearen DNA-Bestandteilen fehlen.

Schließlich gelang der Arbeitsgruppe um P. B o r s t mit Hilfe von Restriktionsendonuclease-Verdauungsexperimenten die Aufklärung der K-DNA im gesamten Genus der Trypanosomatidae ^{41,42,43,44,45)}: Die K-DNA ist heterogen in ihrer Zusammensetzung. Sie besteht aus Minizirkeln, die ein MG von etwa $1,5 - 3 \times 10^6$ haben, und die wiederum nicht einheitlich sind. Ferner enthält die K-DNA eine große Komponente, die Maxizirkel, mit einem MG von 20×10^6 . Diese Maxizirkel sind integrierter Bestandteil des K-DNA-Netzes, und ihre DNA-Sequenz ist nicht mit der der Minizirkel identisch. Sie stellen keine Minizirkeloligomere dar. Der Maxizirkelanteil der K-DNA beträgt 3 - 5 %.

Aus den Zahlen läßt sich abschätzen, daß pro K-DNA etwa 14000 Minizirkel und etwa 40 Maxizirkel angetroffen werden. Die Größe und Anzahl der Maxizirkel bestärkt die Vermutung, daß sie allein die echte mt-DNA der Trypanosomatidae darstellen. Die Aufgabe der Minizirkel bleibt unklar, und A. F a i r l a m b ⁴⁵⁾ bezweifelt sogar, ob sie überhaupt mitochondriale Gene codieren können.

1.2.3. Angriffspunkte und Wirkungsmechanismus kationischer trypanocider Substanzen

Zu dieser Gruppe von Trypanociden gehören Amidine, Ethidium und Anthracycline^R. Sie liegen bei physiologischem pH-Wert hauptsächlich als Kationen vor, weshalb

ihre Aktivität vor allem auf anionische Zellstrukturen gerichtet ist. Besondere Affinität zeigen sie außer zu Nucleinsäuren noch zu Proteinen, Phospholipiden und den sauren Lipoproteinmembranen der Lysosomen ⁴⁶⁾.

Da kationische Substanzen sehr schnell in den Kinetoplasten eindringen können ⁴⁷⁾, gilt dieser und die darin enthaltene DNA als der primäre Hauptangriffspunkt dieser Substanzklassen ⁴⁶⁾. Diese selektive, schnelle Reaktion mit dem Kinetoplasten könnte folgende Gründe haben:

1. Die Membran des Kinetoplasten ist anders aufgebaut als die des Kerns ⁴⁸⁾.
2. In der Nähe des Kinetoplasten sind besonders viele Lysosomen angehäuft. Diese nehmen eine Vielzahl der trypanociden Verbindungen auf und könnten die strukturelle Basis des "Primärrezeptors" für die Substanzaufnahme sein, die P. E h r l i c h ⁴⁹⁾ postuliert hat. Aus den Lysosomen können die Stoffe leicht in den Kinetoplasten gelangen, möglicherweise über das "Reservoir" ⁴⁸⁾.

Eine schnelle Anreicherung in Lysosomen ist u.a. für Stilbamidin und andere Amidine, für Anthrycide^R, Ethidium und für das anionische Suramin gezeigt worden ⁵⁰⁾.

Für eine bevorzugte Reaktion kationischer Trypanocide mit der Kinetoplasten-DNA gelten folgende Argumente als gesichert:

1. Die K-DNA enthält als mitochondriale DNA eine große Anzahl von zirkulären DNA-Molekülen, die vor allem für das Verständnis der Wirkung von interkalierenden Verbindungen, wie Ethidium, von Bedeutung sind ^{50,51,52,53,54)}.
2. Unterschiede in der Basenzusammensetzung zwischen n-DNA und K-DNA:

Die K-DNA hat einen höheren Anteil an Adenin-Thymin-Basenpaaren. Dies könnte eine Ursache der selektiven

Reaktion der Diamidine sein ^{26,46,48}).

3. Die K-DNA ist nicht wie die n-DNA von einer Histonhülle umgeben ⁵⁵), so daß die Trypanocide schneller mit ihr reagieren können.
4. Die Enzyme der DNA-Replikation im Zellkern und im Kinetoplasten scheinen verschieden zu sein ⁴⁸). Ein Unterschied konnte mit Ethidium an isolierter Lebermt-RNA-Polymerase gezeigt werden ⁵⁶).

Der Angriff der meisten kationischen Substanzen auf die K-DNA hat zur Folge, daß keine RNA synthetisiert werden kann. Die zelluläre RNA-Synthese kann hauptsächlich an drei Stellen des Systems inhibiert werden:

1. am Polymeraseenzym
2. am RNA-Primer
3. an der wachsenden Polynucleotidkette ⁵⁷).

Obige kationische Substanzen lagern sich an die K-DNA an und verhindern die Synthese des RNA-Primers ⁵⁷). So ist gezeigt worden, daß für Berenil^R an T.cruzi-K-DNA-Zirkeln vier gleichweit voneinander entfernte, AT-reiche Bindungsstellen existieren, an die auch die RNA-Polymerase gebunden wird ⁵⁸). Ethidium verhindert ebenfalls die Komplexbildung der RNA-Polymerase mit zirkulären DNA-Matrizen ⁵⁹).

Die beiden anderen Angriffspunkte, das Polymerasesystem und die wachsende Polynucleotidkette, können durch nicht-kationische Substanzen beeinflußt werden. Anionisches Suramin hemmt die Polymerase ⁵⁷). Antimetabolite, wie Cordycepin, verursachen letale Störungen in der RNA-Kette, da pathogene Trypanosomen, ebenso wie Malaria-parasiten und Schistosomen offensichtlich nicht zur Eigensynthese von Purinbasen befähigt sind ^{60,61}). Einen wichtigen, jedoch bisher selten beachteten Angriffspunkt stellen die Interaktionen kationischer

Substanzen mit Nucleotiden dar, wobei diese durch Salz-
bildung ausgefällt und inaktiviert werden ⁴⁶⁾. Für die
stabilen Acridiniumverbindungen ⁴⁶⁾, Pentamidin ⁶²⁾ und
Stilbamidin ⁶²⁾ ist eine solche Reaktion mit Schlüssel-
metaboliten beobachtet worden, nicht jedoch für das in-
stabile Berenil^{R 26)}. Diese Reaktion würde genügen, eine
unspezifische trypanocide Wirkung dieser Verbindungen
zu erklären, da sich hierdurch eine Hemmung von Energie-
metabolismus, von Membranfunktionen und von Polynucleo-
tidsynthesen ergibt. Eine selektive Reaktion läßt sich
jedoch dadurch nicht erklären ⁵⁷⁾.

Eine Schädigung der K-DNA zeigt im Elektronenmikroskop
eine Veränderung der DNA-Masse, die über längliche, zer-
klüftete Gebilde und kondensierte amorphe Formen bis
zum Verschwinden, der Dyskinetoplastie, führt. Für nicht
interkalierende Substanzen ist die "chopped sausage"
Form, für interkalierende die amorphe K-DNA charak-
teristisch ^{46,63)}.

Das Verschwinden der K-DNA und die Entstehung der dys-
kinetoplastischen Trypanosomen ist für diese im Wirts-
organismus nicht letal, bei einer erneuten Übertragung
auf den Zwischenwirt Glossina erweisen sie sich jedoch
als nicht lebensfähig. Aus diesem Grunde haben die mei-
sten kationischen Trypanocide nur verzögernde, "trypano-
statische" Wirkung und können die Parasiten oft nicht
aus dem Wirt eliminieren, wie es z.B. mit Organoarsen-
verbindungen gelingt ⁴⁸⁾.

Bei einer trypanociden Wirkung von kationischen Arznei-
mitteln dürften Schädigungen anderer Zellstrukturen mit
einbezogen sein, die auf die primäre Schädigung der K-
DNA folgen und elektronenmikroskopisch sichtbar sind ⁴⁶⁾.

Besonders betroffen ist das Mitochondrium. Die ka-
tionischen Verbindungen reagieren mit Phospholipiden der

Membran und können dadurch die Membranlipidphase passieren. Dies führt zu Erweiterungen und Störungen der mitochondrialen Membransynthese⁴⁶⁾. Ferner werden Ribosomen aggregiert, der Nucleolus wird fragmentiert und nucleares Chromatin wird vermindert. Letztlich erfolgen noch Eingriffe in den Fettstoffwechsel⁴⁶⁾, gesättigte Triglyceride werden in der Nähe der Membran des endoplasmatischen Retikulums abgelagert und die Aufnahme von ungesättigten Fettsäuren blockiert⁵⁷⁾.

1.2.4. Unterschiede in der Wirksamkeit

In vitro zeigen die meisten der zeitweise verwendeten, kationischen trypanociden Substanzen, wie Anthrycide^R, Ethidium oder Berenil^R, sehr ähnliche Wirksamkeit sowohl gegen menschen-, als auch gegen tierpathogene Trypanosomen der brucei- bzw. congolense-vivax-Gruppe. In vivo zeigen sich aber erhebliche Unterschiede. So sind etwa Ethidium und Anthrycide^R viel schwächer gegen T. brucei-Infektion wirksam. Nur Berenil^R ist auch in vivo gegen beide Typen ähnlich gut wirksam⁵⁷⁾. Dies könnte an einer unterschiedlichen Verteilung der Substanzen im Wirtsorganismus liegen⁶⁴⁾, zumal T. brucei ausgesprochene Gewebeparasiten und T. congolense und vivax hauptsächlich Blutparasiten sind. Die unterschiedliche in vivo Wirksamkeit erklärt sich durch die schnelle Anreicherung von Berenil^R und verwandten Diamidinen im Gewebe^{57,64)}. Außerdem besteht eine unterschiedliche Wirksamkeit gegen argininspezifische Serinproteinasen⁶⁵⁾.

1.3. Ausgangspunkt und Zielsetzung der eigenen Untersuchungen

Auf Grund der oben geschilderten Eigenschaft kationischer Substanzen, an Nucleinsäuren zu binden, sollte mit Hilfe literatur-beschriebener Bindungsstudien eine qualitative und quantitative Untersuchung des DNA-Bindungsvermögens dieser Substanzen durchgeführt werden. Daß sich eine basenpaarspezifische Interaktion der heteroaromatischen biskationischen Verbindungen ergeben würde, war auf Grund der Beobachtungen von D. H. W i l l i a m s o n ⁶⁶⁾ mit Hefe-DNAs zu erwarten.

Als Modell-DNAs dienten die DNAs aus *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* und *Clostridium acidu-urici*, sowie in abschließenden orientierenden Versuchen die chromosomale und Kinetoplasten-DNA aus *T. rhodesiense*.

Mit den Untersuchungen sollte eine etwaige Korrelation zwischen DNA-Spezifität und -Affinität auf der einen Seite und der trypanociden, antileukämischen, bakteriziden und fungistatischen Aktivität der Substanzen auf der anderen Seite aufgespürt werden.

2. Prokaryonten-DNA als Modell zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Interaktionen mit kationischen Liganden

2.1. Gleichgewichtsdialyse

W. M ü l l e r et al.⁶⁷⁾ beschrieben eine Gleichgewichtsdialysemethode, die sich zur qualitativen und quantitativen Bestimmung einer DNA-Ligand-Interaktion eignet. Sie wird in einer dreiteiligen, zylindrischen Gleichgewichtsdialyseapparatur aus Teflon durchgeführt, die so konstruiert ist, daß mittels zweier Dialysmembranen, die zwischen die einzelnen ringförmigen Kammerteile geklemmt werden, abgeschlossene, nach außen dichte Kompartimente entstehen. Zur Füllung und Probenentnahme ist an jedem Kompartiment ein Bohrloch mit Stopfen angebracht. Die Teflonzelleneinheit ist mit Schrauben und Spangen in ein Traggestell aus rostfreiem Stahl eingespannt, welches an einem Metallrahmen befestigt ist, der mehrere solcher Zellen tragen kann. Diese werden in einem thermostatisierbaren Wasserbad mittels eines Elektromotors mit ca 20 - 50 UpM bewegt. Das Kammervolumen beträgt 6,0 ml; die Kammer wird mit 5,0 ml Lösung gefüllt, sodaß die Durchmischung des Zelleninhalts durch die damit vorhandene Luftblase erfolgt. Zur Gleichgewichtseinstellung rotieren die Zellen 24 - 48 Stunden im Wasserbad, wo sie vor Licht geschützt und auf $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ thermostatiert werden.

Für die Anfertigung und Wartung der Gleichgewichtsdialyseapparatur danke ich herzlich dem Werkstattmeister des Instituts, Herrn W. K e l l e r.

2.1.1. Methode für gut lösliche Substanzen

DNA-Bindungsisothermen (28,29,30,67) werden gleichzeitig für zwei DNAs unterschiedlichen AT-Gehalts in einer Drei-Zellen-Dialyseapparatur bestimmt.

Gut in den Puffersystemen (vgl. S. 61) lösliche Liganden werden üblicherweise mit hoher Konzentration begonnen und nach jeder Gleichgewichtseinstellung vermindert.

Die Konzentration des freien Ligandenanteils wird spektralphotometrisch gegen ligandenfreies Lösungsmittel, die Konzentration des gebundenen Liganden durch Differentialspektroskopie des Komplexes gegen die freie Ligandenkonzentration als Vergleich gemessen. Zur Konzentrationsberechnung wird der molare Extinktionskoeffizient der Liganden benutzt, der in separater Bestimmung in Puffer-, DNA- und SDS-haltiger Lösung ermittelt wurde.

Ferner wird die Membranpassierbarkeit der Liganden voruntersucht, indem die mittlere Kammer mit einer Ligandenlösung, die äußeren mit Puffer gefüllt werden. Nach 24 Std werden die Konzentrationen an Ligand in allen drei Kammern bestimmt und nur solche Liganden in Gleichgewichtsdialyseexperimente eingesetzt, bei denen die Passierbarkeit der Membran über 80 % liegt.

2.1.2. Methoden für schwer lösliche Substanzen

Bei schlecht löslichen, gelösten Verbindungen wird der umgekehrte Weg beschritten. Die DNA ist mit einer eben noch meßbaren Menge Ligand beladen und wird dann schrittweise immer mehr beladen, bis sich im Spektrum des Liganden eine DNA-Ligand bzw. nur Ligand-Ausfällung zeigt.

Bei sehr schwer löslichen Liganden und Substanzen, deren

Membranpassage kleiner als 80 % ist, wird in verdünnter Lösung der molare Extinktionskoeffizient bestimmt. Die äußeren Kammern werden mit DNA-Lösungen gefüllt, in die mittlere Kammer wird eine gesättigte Lösung bzw. Suspension des Liganden eingefüllt. Nach 48 Std Gleichgewichtseinstellung werden die klaren äußeren Kammern und die mittlere mit der Substanzsuspension entleert, der Inhalt 30 Minuten bei 10000 UpM zentrifugiert und die Überstände wieder in die gereinigten und mit neuen Membranen versehenen Kammern eingefüllt. Nach weiteren 48 Std Gleichgewichtseinstellung kann nach der normalen Methode weiterverfahren werden, indem die zur Meßung entnommenen Probenmengen in den äußeren Kammern durch frische DNA-Lösungen ergänzt und die entleerte mittlere Kammer ganz mit frischer Pufferlösung aufgefüllt werden.

Zeigt sich nach der ersten Gleichgewichtseinstellung auch in den äußeren DNA-Kammern nach dem Zentrifugieren ein Sediment aus DNA und Ligand, so wird diese geleerte DNA-Kammer mit neuer DNA-Lösung aufgefüllt.

In der Regel können jedoch auf diese Weise nur Konzentrationsverhältnisse von kleiner 0.1 erzielt werden, da die Schwerlöslichkeit eine weitere Messung nicht zuläßt.

2.1.3. Methode für Substanzen mit kurzwelligem Absorptionsmaximum

Bei der Bestimmung von farblosen Liganden, deren langwelligstes Maximum sich mit dem Maximum der DNA überdeckt, wird folgende Variation angewendet:

In Vorversuchen wird eine Eichkurve aufgestellt. Dazu werden jeweils unterschiedliche Ligandenkonzentrationen mit dem gleichen Volumen DNA-Lösung in Puffer 1 Std äquilibriert, durch Zusatz von 10 % SDS-Lösung wird der

Komplex zerstört und dann der Ansatz mit dem zweifachen Volumen Ethanol überschichtet, wodurch die DNA ausfällt; nach dem Abzentrifugieren wird im wässrig-ethanolischen Überstand die Konzentration an Ligand gemessen. Analog kann dann mit dem Inhalt der Gleichgewichtsdiälysekammern verfahren werden.

2.1.4. Dialyse-Membranen

Gute Erfolge werden nur mit relativ unpolaren Membranen erzielt, da sich die untersuchten Liganden sehr stark an alle anionischen Gruppierungen anlagern. Am besten bewährt sich regenerierte Zellulose, Typ Visking 27/32 von der Firma Union Carbide, Chicago USA. Sie hat laut Hersteller eine Dicke von ca. 25 μm und MG-Ausschlußgrenzen von 12000. Ebenso zeigte die YM-Membran der Firma Amicon eine 100 %ige Durchlässigkeit für DAPI vom MG 350,3, während die "inerte" PM-Membran der Firma Amicon DAPI quantitativ so fest adsorbierte, daß auch nach wochenlangem Wässern die Membran noch lebhafte fluoreszierte.

2.2. Andere Bestimmungsmethoden

2.2.1. Zwei-Phasen-Verteilung

Ziel der Untersuchungen sollte es sein, mit einer DNA-Lösung als Unterphase und einer geeigneten organischen Oberphase ein gegenüber der DNA-freien Verteilung geändertes Konzentrationsverhältnis des Liganden zu erzielen und daraus die Affinität und Spezifität des Liganden zu der verwendeten Nucleinsäure zu berechnen⁶⁸⁾.

Lösungen des Liganden von unterschiedlicher Konzentration in BPES-Puffer pH = 7,0 wurden dazu 10 Minuten bei Zimmertemperatur mit einem geeigneten, mit Wasser nicht oder nur sehr gering mischbaren organischen Lösungsmittel durch langsame Rotation vermischt. Die Phasentrennung wurde durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 4000 UpM erreicht. Die Konzentration des Liganden in der Ober- und Unterphase wurde spektralphotometrisch gegen reine Ober- und Unterphase gemessen, die unter gleichen Bedingungen erhalten wurden.

Keines der untersuchten Lösungsmittel lieferte jedoch eine befriedigende Anreicherung des untersuchten Liganden DAPI in der organischen Phase, so daß diese Methode nicht weiter verfolgt wurde. Als Verteilungsmedien wurden untersucht:

1. BPES / Octanol
2. BPES / n-Heptan + 20 % Isoamylalkohol
3. BPES / n-Butanol + Cyclohexan 1 + 1
4. BPES / Isoamylalkohol
5. BPES / Essigester
6. BPES / n-Butanol + Octanol 1 + 1

2.2.2. Gelfiltration

Angeregt durch die DNA/Berenil^R - Interaktionsstudien von B. A. N e w t o n ⁶⁹⁾, der die Methode von F a i r - c l o u g h und T r u t o n ⁷⁰⁾ anwandte, wurde versucht, diese Methode auf DAPI anzuwenden.

Dazu soll eine Sephadex G - 25 Gelsäule mit einer Ligand-
lösung bestimmter Konzentration äquiliбриert werden. Auf
diese Säule gibt man eine Ligand - DNA - Mischung und
eluiert mit obiger Ligandlösung und sammelt in Fraktio-
nen. Bedingt durch das Gel wandert der Ligand/DNA - Kom-
plex im Ausschlußvolumen der Säule und reißt mehr Ligand
mit, so daß die Ligandenkonzentration zunächst über den
Gleichgewichtspunkt ansteigt, im späteren Verlauf der
Elution unter diesen Wert abfällt und schließlich zum
Nullpunkt zurückkehrt. Aus der Fläche des Elutionspro-
fils läßt sich die Menge Ligand berechnen, die von der
DNA gebunden wurde.

Diese Methode ließ sich nicht auf DAPI übertragen. Ver-
suche mit DAPI-Lösung $c = 2 \times 10^{-5}$ m als Elutionsmittel
und einer aufgegebenen Mischung DAPI/DNA = 0,14 waren
nicht reproduzierbar, und das Elutionsprofil sah bei
einer wiederholten Messung anders aus.

Vermutlich wird DAPI sehr stark an Sepharose gebunden,
so daß diese unterschiedlichen Ergebnisse zustande kamen.

3. Ergebnisse

3.1. Spektrale Verschiebungen

Die untersuchten Verbindungen zeigen ihre Interaktion mit DNA durch eine Verschiebung des langwelligen Maximums im Elektronenspektrum nach größeren Wellenlängen und in der Regel mit einer Erniedrigung des Extinktionskoeffizienten an. Die Verschiebungen sind abhängig vom Konzentrationsverhältnis r zwischen Ligand und DNA, sowie von dem Anteil an AT-Basenpaaren in der DNA.

3.2. DNA-Affinitäten und Spezifitäten

Fast alle untersuchten Substanzen zeigen Spezifitätsparameter $\alpha < 0,5$, d.h. sie benötigen mehr als ein AT-Paar als optimale Bindungsstelle ²⁸⁾.

Siehe Tabelle Nr.2 Seite 95f. und Abbildungen Nr.3 - 6.

3.2.1. Grundtyp A

Aus den Bindungsparametern läßt sich folgendes ableiten:

1. Veränderung der kationischen Flanke

Der Ersatz der Amidinogruppen durch Imidazolinylreste hat kaum einen Einfluß auf die DNA-Spezifität und Bindungsaffinität, wie z.B. der Vergleich von den Verbindungen Nr.1 und Nr.2 zeigt.

2. Isostere Veränderungen

Drastische Veränderungen in der Stärke der Wechselwirkungen zwischen DNA und dem Liganden ergeben sich, wenn das Heteroatom des Ringsystems in Nr.1 verändert wird. So verringert sich die Bindungsaffinität an B. subtilis-DNA für das Thionaphthen-S-dioxid (Nr.6) um den Faktor 5, für das Thionaphthenderivat (Nr.3) um

den Faktor 10 und für das Benzofuranderivat (Nr.4) um den Faktor 13.

Ebenfalls ändert sich die AT-Spezifität der Verbindungen und nimmt in folgender Reihe ab:

$\text{NH} \gg \text{SO}_2 > \text{O} > \text{S}.$

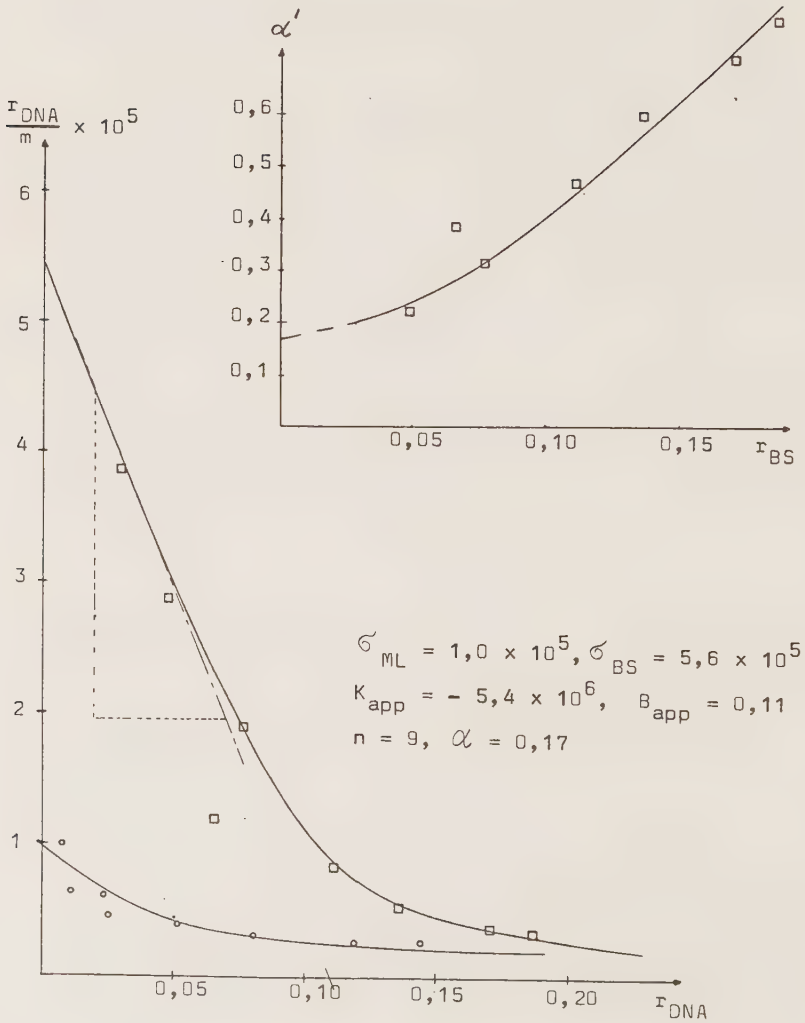
3. Substitution einer kationischen Flanke

- a) Wird die Imidazolinyllgruppe der Verbindung Nr.4 in Position 5 durch eine Aminogruppe ersetzt (Nr.6), so sinkt die Affinität um ca. eine Zehnerpotenz ab, die geringe AT-Spezifität bleibt erhalten.
- b) Ein Ersatz der 4'-Imidazolinyllgruppe in Nr.2 durch Amino läßt die Affinität um den Faktor 6 sinken und die Spezifität der Verbindung Nr.8 wird ebenfalls geringer.
- c) Die Acetylierung der Aminogruppe (Nr.9) zeigt jedoch Überraschenderweise eine bessere Affinität und Spezifität als die freie Aminogruppe. Möglicherweise spielt hier die Molekülgröße eine Rolle. Die Acetaminogruppe ist etwa so groß wie die Amidino- oder Imidazolinyllgruppe.
- d) Der Wegfall der 4'-Amidinogruppe läßt die Spezifität sinken, und die Affinität erniedrigt sich um ca. eine Zehnerpotenz (Nr.7).
- e) Der Ersatz der kationischen Gruppierung in 4' durch nichtionische Reste hat nur geringen Einfluß auf die AT-Spezifität, jedoch sinkt die Affinität im Falle der phenolischen OH-Gruppe (Nr.10) um den Faktor 7, bei dem Methylether (Nr.11) um den Faktor 10 gegenüber der Referenzverbindung DAPI (Nr.1).

4. Substitution des Phenylrings in Position 2

- a) Der Wegfall des Phenylrings (Nr.55) läßt die Affinität auf 10 % von Nr.1 absinken, der Austausch gegen $-\text{CH}=\text{CH}-$ (Nr.56) nimmt zwischen beiden einen

Abbildung Nr.3



Bindungsisothermen für 6-(2-Imidazolin-2-yl)-2- { 4- [4-(2-imidazolin-2-yl)phenoxy] -phenyl } indol-dihydrochlorid (Nr.39) an *Micrococcus luteus*-DNA (27,5 % AT) $\circ$ — $\circ$ und *Bacillus subtilis*-DNA (55,5 % AT) $\square$ — $\square$ in BPES-Puffer pH = 7,0. Oben eingesetzt die graphische Darstellung zur Ermittlung des Spezifitätsparameters α .

$$\frac{r_{BS}}{m} \times 10^n$$

Abbildung Nr.4

Bindungsisothermen der besten DNA-Liganden an
B.subtilis-DNA in Cacodylat-Kochsalz-Puffer

Nr.1, n = 5

X — X

Nr.28, n = 6

● — ●

Nr.40, n = 5

○ — ○

Nr.53, n = 6

□ — □

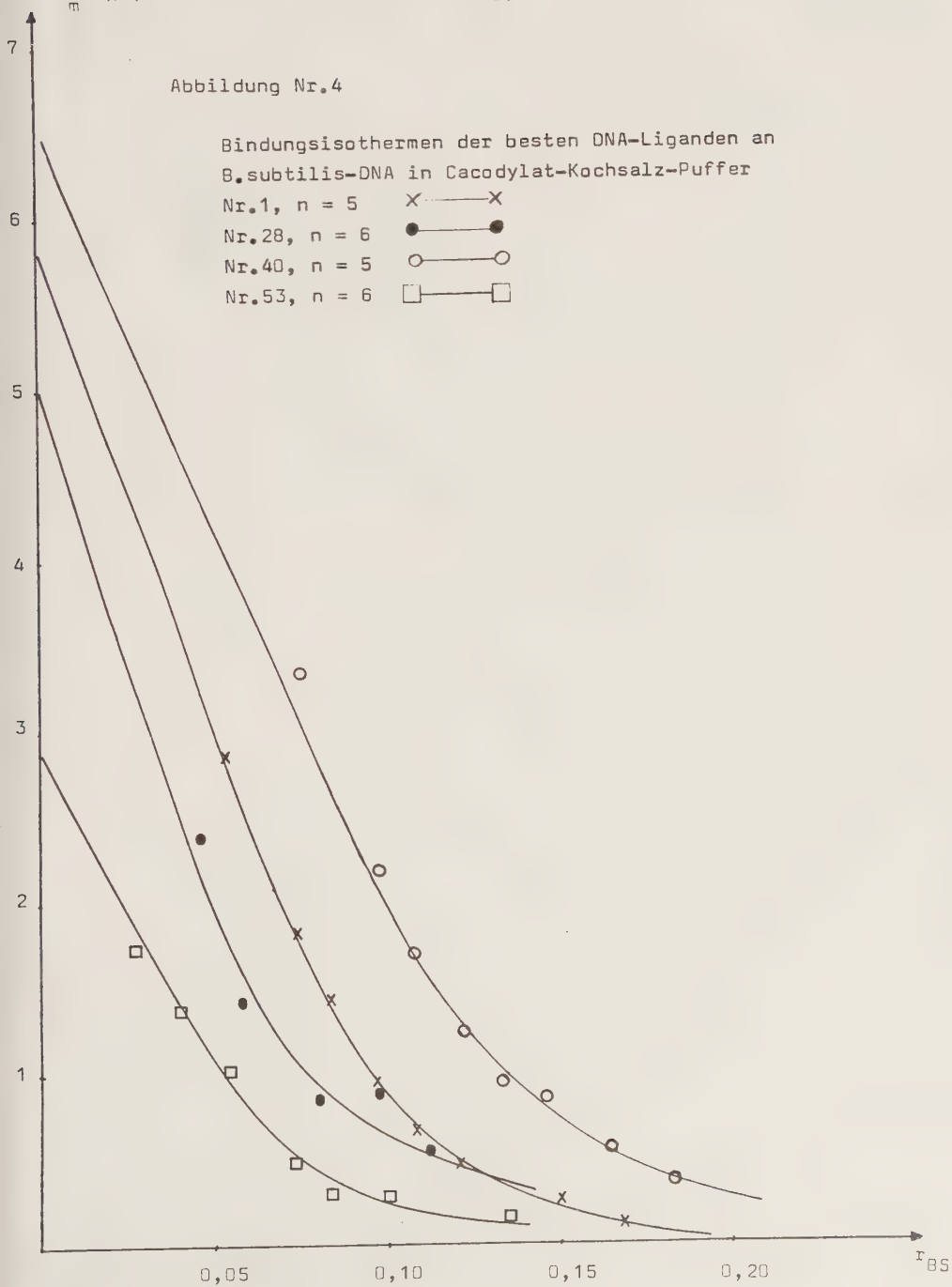


Abbildung Nr.5

Meßwerte aus fünf Bestimmungen der Bindungisothermen von Verbindung Nr.1 (DAPI) an *C.acidurici*-DNA (a), *B.subtilis*-DNA (b-d) und *M.luteus*-DNA (e-h)

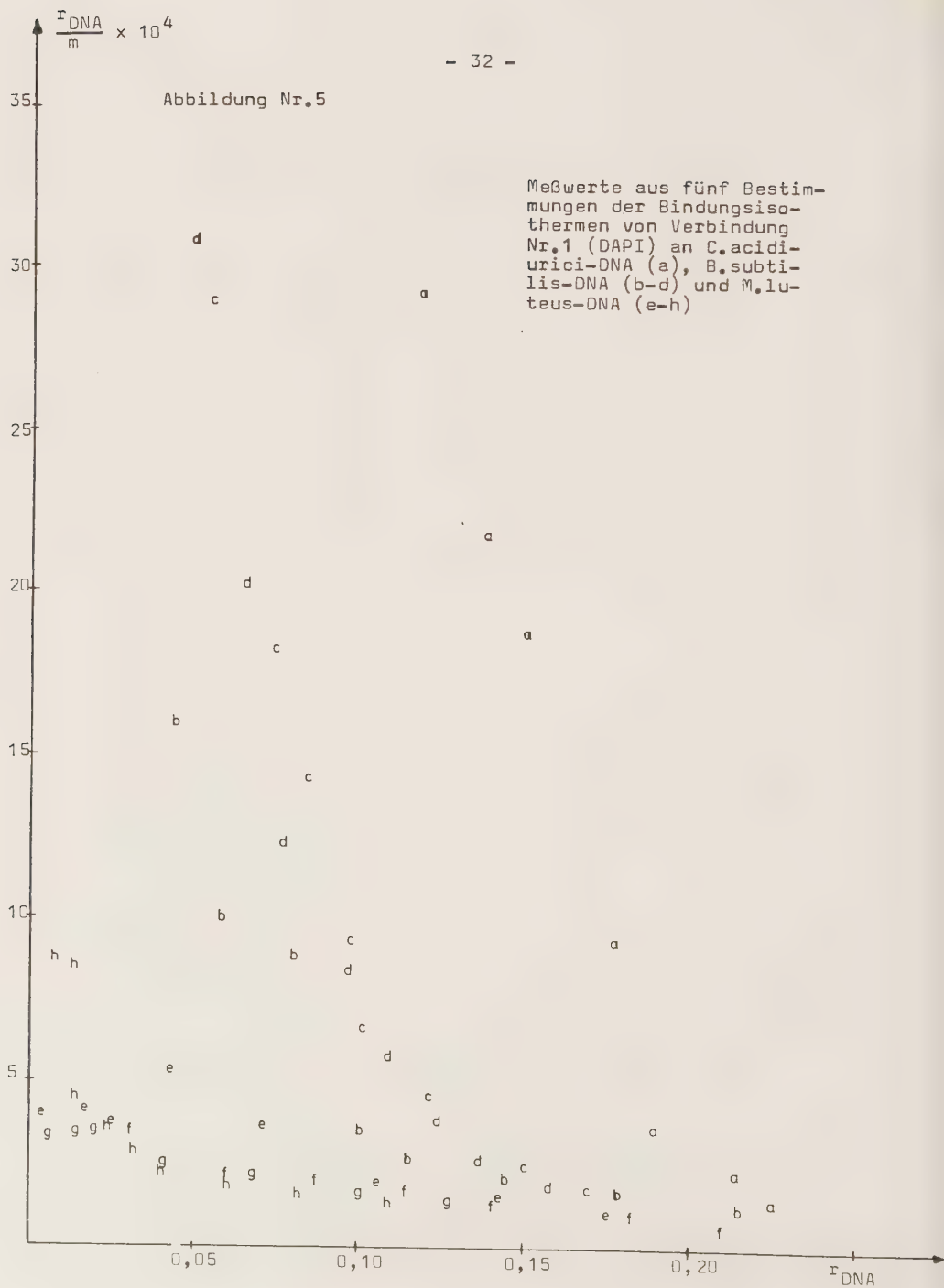
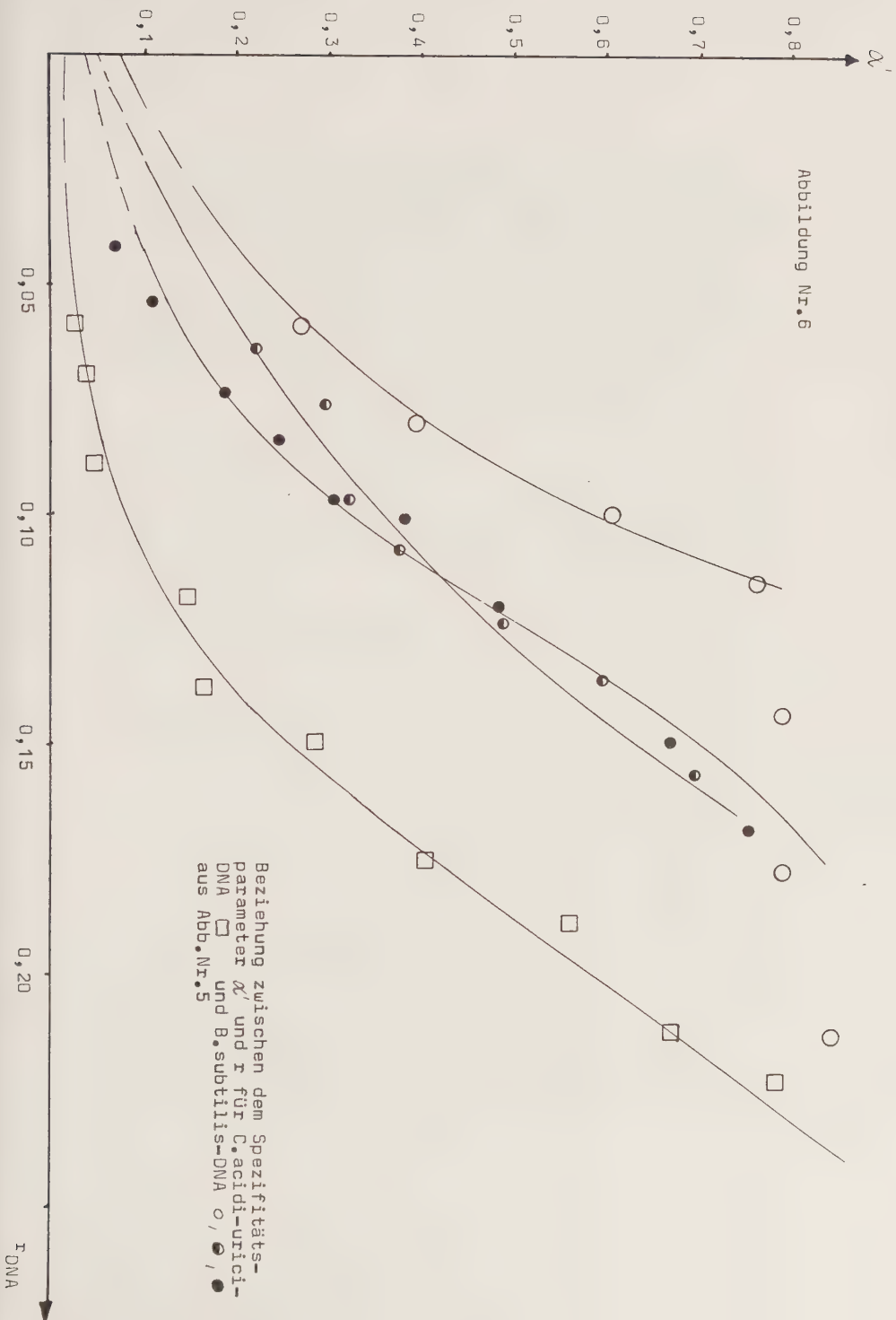


Abbildung Nr.6



Mittelplatz ein. Viel geringere Auswirkungen haben beide Veränderungen dagegen auf die AT-Spezifität.

- b) Die Einführung einer zusätzlichen polaren Gruppe am Phenylring, wie die einer OH-Gruppe in Position 2' (Nr.54), hat auf die Spezifität keinen Einfluß, jedoch sinkt wieder die Bindungsfähigkeit ab, da die OH-Gruppe sicherlich mit der benachbarten NH-Gruppierung des Indolrings interferieren kann. Die Affinität wird um den Faktor 2 gemindert.

5. Zusätzliche Substituenten

Indolamidine, die in 1- bzw. 3-Stellung substituiert sind, zeigen generell eine geringere Neigung als DAPI an DNA zu binden.

- a) Die Substitution von Position 3 bringt sowohl eine Verringerung der Affinität als auch der Spezifität mit sich.

Für die Bindungsspezifität kann folgende Reihe aufgestellt werden:

DAPI (Nr.1, $\alpha = 0,06$)

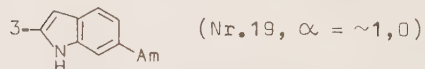
3-CH=NOH (Nr.15, $\alpha = 0,08$)

3-COOH (Nr.18, $\alpha = 0,10$)

3-COOCH₃ (Nr.17, $\alpha = 0,11$)

3-Cl (Nr.14, $\alpha = 0,15$)

3-CH₂-N(Et)₂ (Nr.16, $\alpha = 0,27$)



Je größer der Substituent ist, umso größer ist die sterische Hinderung des Liganden, sich möglicherweise zwischen zwei benachbarte Basen zu schieben, bzw. sich an eine Base anzulagern. Daß bei den Verbindungen Nr.17 und Nr.18 eine höhere Spezifität vorliegt als bei dem kleineren Cl (Nr.14), könnte durch eine

teilweise Verseifung und/oder Decarboxylierung zum freien DAPI zu erklären sein. Denkbar ist auch die Möglichkeit, daß die Carbonsäure mit Amidinogruppen in Wechselwirkung tritt und über Außenanlagerungen mehrere Moleküle pro Bindungsstelle anlagert. Die Einführung von zusätzlichen Stickstoffen in der Seitenkette an C_3 , mit der denkbaren Möglichkeit, weitere Fixierungspunkte zu schaffen, wird durch die erwähnten sterischen Hinderungen überkompensiert (Nr.15, Nr.16). Im letzteren Fall sinkt die Affinität sogar erheblich ab.

Die Einführung eines 6-Amidinoindols in die 3-Stellung suggeriert auf den ersten Blick eine immense Zunahme der Bindungsfähigkeit an DNA. Jedoch geht ohne Zweifel die AT-Spezifität verloren (Nr.19, Nr.19a).

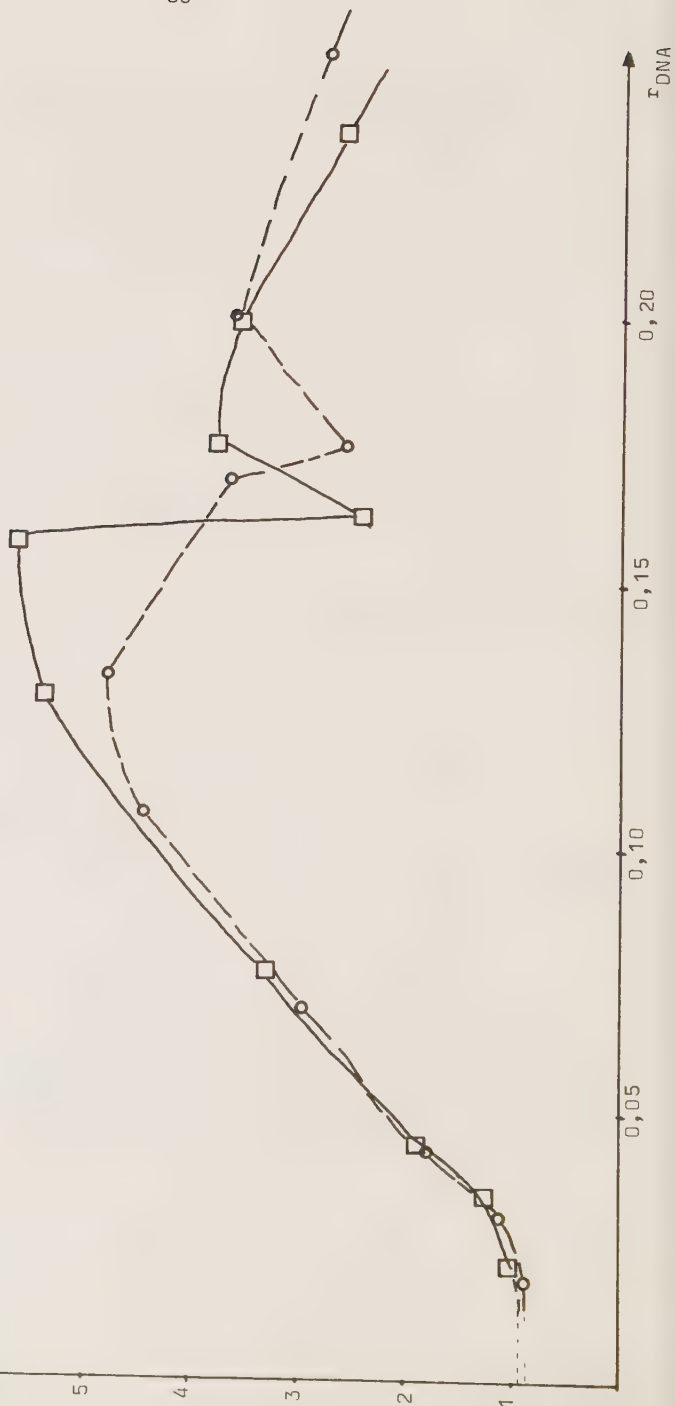
Die Scatchard-Abbildung ⁷¹⁾ der Bindungsisothermen zeigt einen ungewöhnlichen Verlauf (Abbildung Nr.7). Im hohen Beladungsteil mit r -Werten zwischen 0,15 und 0,25 zeigen beide Verbindungen eine (extrapolierte) DNA-Affinität, die weit über der von DAPI liegt. Im niedrigen Beladungsteil ($r \rightarrow 0$) sinkt diese jedoch linear ab, und der Endwert paßt sich in die Reihe der anderen 3-substituierten Derivate ein. Dieser Isothermenverlauf ist nur mit einem kooperativen Bindungsprozeß zu erklären, bei welchem unter relativ hoher Ligandkonzentration Außenauflagerungen mehrerer Liganden oder Quervernetzungen mehrerer DNA-Moleküle verantwortlich sind.

- b) Die Substitution des Wasserstoffs am Indolstickstoff wirkt sich sehr stark auf die Bindung an DNA aus. Die Einführung einer Diethylaminoethyl-Gruppe (Nr.12) und einer Acetamidinogruppe (Nr.13) verändert die

$\frac{r_{DNA}}{m} \times 10^5$

Abbildung Nr. 7

Bindungsisothermen für 6-(2-Imidazolin-2-yl)-3-[6-(2-imidazolin-2-yl)-2-indolyl]-2-[4-(2-imidazolin-2-yl)phenyl]-indol-trihydrochlorid (Nr. 19a) an M.luteus-DNA o---o und B.subtilis-DNA □---□ in BPES-Puffer pH = 7,0, mit deutlichem kooperativen Bindungsverhalten



DNA-Spezifität auf ca. 0,70, die Affinität für *M. luteus*-DNA sinkt um den Faktor 9, für *B. subtilis* um den Faktor 85 für Nr.12, für Nr.13 um die Faktoren 36 bzw. 300. Daraus läßt sich folgern, daß der freizugängliche Stickstoff mit seinem Wasserstoffatom ein wesentliches Kriterium für die DNA-Affinität und die AT-Spezifität der Indole darstellt und welcher durch andere Heteroatome noch durch die kationische Amidinogruppe ersetzt werden kann.

3.2.2. Phenoxyerweiterungen

Auffällig ist, daß die DAPI-analoge Verbindung Nr.40 beinahe ähnliche Bindungsparameter aufweist wie Nr.1, nur ist die Anzahl der Bindungsplätze n , die ein Ligand auf der DNA beansprucht, geringfügig größer, was mit den größeren Ausmaßen der Verbindung in Einklang steht.

Der Austausch der Amidino- bzw. Imidazolinylgruppe am Phenylring gegen Amino macht sich hier nicht so stark bemerkbar wie in Gruppe A. Beim Übergang von Verbindung Nr.2 nach Nr.8 ändert sich α von 0.06 nach 0.17, bei den analogen Substanzen Nr.40 und Nr.41 von 0.05 nach 0.14. Die Affinitätswerte der phenoxyerweiterten Typen liegen jedoch enger zusammen als die der einfachen Grundtypen.

Die Positionsveränderung der Amidinogruppe von 4' nach 3' zeigt kaum Einflüsse auf die Spezifität oder Affinität (Nr.40, Nr.42), wohingegen die Verschiebung der Amidinogruppierung von 6 nach 5 in einer starken Verschlechterung der Bindungseigenschaften resultiert (Nr.40, Nr.44).

Die Verbindung Nr.43, bei der die Anellierung der Phen-

oxygruppe in 3'-Stellung des Phenylrings erfolgte, zeigt gegenüber der 4'-substituierten Nr.40 kaum eine Verschlechterung der Bindungsparameter.

Nr.45 und Nr.47 haben zusätzlich eine Vineleinschiebung. Diese könnte die Ursache für das völlig unregelmäßige Bindungsverhalten der Verbindungen darstellen, ein Strukturelement, das auch bei Verbindungen des Typs C zu Problemen führt. Extrapolieren der Bindungsdaten zeigt, daß die Verbindung bei einer mittleren AT-Spezifität eine hohe Affinität zu DNA besitzt.

Erschwert wird die Messung dieser und ähnlich gebauter Verbindungen einmal durch ihre Schwerlöslichkeit in Pufferlösung, durch die Tendenz DNA-Liganden-Komplexe zu bilden, die noch bei r-Werten um 0,1 ausfallen, und durch ihre starke DNA-Affinität, die mit sich bringt, daß der freie, nicht DNA-gebundene Ligandenanteil immer an der Meßgrenze liegt.

Die Schwerlöslichkeit dieses Verbindungstyps und sein irreguläres Bindungsverhalten geht mit der Hydrierung der Vinyl-Doppelbindung verloren. Verbindung Nr.46 zeigt einen normalen Verlauf der Scatchard-Auswertung mit schwacher DNA-Affinität und mittlerer AT-Spezifität.

3.2.3. Kohlenwasserstoff-verbrückte Strukturen

Die Verbindungen aus der Reihe der Kohlenwasserstoff-verbrückten Ringsysteme zeigen meist eine sehr schlechte Löslichkeit in isotonischer Kochsalz-Puffer-Lösung, ferner eine starke Neigung, DNA schon bei sehr niedrigen r-Werten auszufällen bzw. unlösliche Komplexe zu bilden, und mit diesen Konglomeraten die Poren der Membran zu verstopfen.

Die Beladung der DNA erfolgt mittels Suspensionen, wie unter 2.1.2. beschrieben.

Die Liganden dieses Typs zeigen keine überragenden AT-Spezifitäten, jedoch eine äußerst intensive Bindungsneigung an DNA. Die α -Werte liegen in der Größenordnung von 0.3, was nach S.71 zwei AT-Paaren als optimaler Bindungsstelle entspricht.

1. Verbindungen mit nur einem Heteroatom

Das Indolderivat Nr.30 zeigt bis in niedrigste Beladungswerte eine starke DNA-Ausfällung, so daß eine ungestörte Ermittlung der Bindungsisothermen nicht möglich ist. Andererseits zeigt dies seine ungemein starke Affinität zu DNA an. Dies ist auch dem Thionaphthen (Nr.33) zu eigen, das mit seinen Bindungsparametern in die Region von DAPI vorstößt.

Das Benzofuran-Derivat (Nr.32) zeigt ein Phänomen, das sich bei Verbindung Nr.19 im niedrigen Beladungsteil angedeutet hat. Es hat bei Beladungsverhältnissen über 0.1 höhere Affinitäten als bei $r \rightarrow 0$, so daß sich aus der Scatchard-Auftragung eine positive Steigung ergibt. Solche Beobachtungen wurden z.B. schon bei der Wechselwirkung von Tetrazyklinen und Opiaten mit Proteinen beschrieben ^{72,73,74}) und deuten kooperative Bindungsprozesse an.

Beim entsprechenden Diamidin (Verbindung Nr.31) zeigt eine Bestimmung einen ähnlichen Befund; in schwach saurem Milieu (CS-Puffer) ergibt sich für *B.subtilis* eine Scatchard-gemäße Auswertung. Sie zeigt die den Benzofuranen eigene schwache Bindung an DNA an. Daß sich für *B.subtilis* dennoch ein höherer Wert ergibt als bei Verbindung Nr.4 könnte ein Beitrag der Doppelbindung sein.

2. Gemischte heterozyklische Verbindungen

Die höchste Affinität hat das 2,2-ethylenverbrückte Indolyl-thionaphthen (Nr.38). Jedoch ist hier eine Messung nur unterhalb von $r = 0.07$ möglich, so daß keine Aussagen zu dem Mittel- und Hochbeladungsbereich gemacht werden können. Es folgen die Benzofuranindole (Nr.34, Nr.35), ersteres mit Am-, das Zweite mit Im-Gruppen, die nahe beieinander liegende Affinitätswerte von ca. 3×10^5 für B.subtilis-DNA zeigen, und dann das Stellungsisomere Nr.36.

Die Hydrierung der Doppelbindung zwischen den Ringssystemen (Nr.37) bedingt gegenüber Verbindung Nr.34 einen Rückgang der Spezifität um den Faktor 2 und der Affinität um fast eine Zehnerpotenz.

3. Ein Heterozyklus verbunden mit einem Phenylring

Das Indolderivat Nr.48 stellt eine vinyloge Übergangsverbindung zwischen Typ A und C dar. Unverkennbar ist seine gute AT-Spezifität, die noch stark an DAPI (Nr.1) erinnert, gepaart mit der hohen Bindungsaffinität der Gruppe C.

Mit der Benzofuranverbindung Nr.49 zeigt sich der ungünstige Einfluß des Benzofurans auf die DNA-Bindungsstärke. Die Bindungsparameter unterscheiden sich nur geringfügig von denen der nicht verbrückten Verbindung Nr.4.

3.2.4. Direkt kondensierte Ringsysteme

1. 2,6-Verknüpfung

Hier ragt eine Verbindung heraus (Nr.53), deren Spezifitätsparameter noch deutlich über der von Nr.1 liegt, und deren DNA-Bindungsbestreben sehr stark ist. Wahrscheinlich liegt hier ein Optimum der Molekülgröße

vor, denn ein α -Wert von 0.03 entspricht etwa 5 benachbarten AT-Paaren als optimaler Bindungsstelle.

2. 2,2-Verknüpfung

Die beiden untersuchten 2,2-verknüpften Verbindungen zeigen wieder deutlich den stark die Bindung beeinflussenden Ersatz von Stickstoff durch Sauerstoff. Das Derivat Nr.29 hat eine um den Faktor 2,5 schwächere AT-Spezifität und eine um den Faktor 40 schwächere Affinität zu *B.subtilis*-DNA als das Biindol Nr.28.

3.2.5. Berenil^R-Abkömmlinge

Die Veränderung der kationischen Flanke von Bisamidin in Berenil^R (Nr.20) über das gemischte Derivat Nr.21 zu der Bis-imidazoliny-Verbindung Nr.22 äußert sich in einer geringfügigen Verbesserung der AT-Spezifität und in geringfügigem Abfall der DNA-Affinität. Ein isosterer Ersatz des doppelt gebundenen Stickstoffs in Nr.20 gegen Kohlenstoff wirkt sich ebenfalls nicht besonders auf die Bindungseigenschaften an DNA aus.

Wird jedoch statt eines Benzols ein Benzofuran mit einer Amidinogruppe in 5-Stellung eingebaut (Nr.50), so resultiert daraus ein Abfall der AT-Spezifität und der Affinität.

Die starke AT-Spezifität der Verbindungen Nr.20-23 geht verloren, wenn die Stickstoff-haltige Zwischenkette mittels eines Ethylenbügels zu einem Pyrazolinderivat ringgeschlossen wird. Im Vergleich zu der direkt verwandten Verbindung Nr.23 sinkt die Affinität zu *B.subtilis*-DNA bei Nr.24 um den Faktor 4.

Im Benzimidazolinderivat Nr.52 dürfte hauptsächlich der Ersatz der Amidinogruppe gegen Amino die Ursache der ge-

ringen Bindungsneigung sein, eine Tatsache, die schon bei Verbindung Nr.6 beschrieben wurde. Bei phenoxyerweiterten Strukturen (Nr.51, Nr.25) ist zu beobachten, daß die Spezifität zurückgeht. Die DNA-Affinität der Verbindung Nr.51 ist etwa so groß wie die von Nr.50, die von Nr.25 sogar noch etwas größer als die von der direkt vergleichbaren Nr.24.

3.2.6. Vergleichsverbindungen

Bei den bekannten DNA-Liganden bzw. trypanociden Arzneimitteln finden wir extrem stark GC-, AT-, sowie unspezifisch bindende Verbindungen.

Zu den bekanntesten DNA-Liganden zählt Ethidium, welches für *M.luteus*- und *B.subtilis*-DNA Affinitätswerte größer als 10^5 liefert und eine Bevorzugung für GC-Paare hat. Im Samorin^R (Isomethamidium) sind Strukturelemente von Ethidium und Berenil^R vereinigt. Es resultiert eine wenig AT-spezifische, aber äußerst DNA-affine Verbindung, deren Bindungsparameter für *B.subtilis*-DNA sowohl den von Ethidium als auch den von Berenil^R alleine um eine Zehnerpotenz übersteigt.

Im ähnlich konzipierten, dem Berenil^R analogen Benzofuran-derivat Nr.50 hebt sich dagegen die Wirkung etwas auf. Die Verbindung H 33258, ebenfalls ein bekannter DNA-Ligand, zeigt eine gute AT-Spezifität und sehr starke DNA-Affinität, wohingegen das trypanocid hochwirksame Anthrycide^R keine Bevorzugung für bestimmte Basenpaare erkennen läßt und auch nur eine mäßige Affinität aufweist.

Die Bestimmung der Bindungsparameter von Pentamidin (Nr.26) und dem Terephthalanilid (Nr.27) stößt auf die Schwierigkeit, daß sich deren langwelligstes UV-Maximum

in SDS-haltiger Lösung in einem Wellenlängenbereich von 270 bzw. 274 nm befindet und mit dem Maximum der DNAs bei ca. 260 nm interferiert. Die Messung erfolgt nach der auf S.24 beschriebenen Methode, die Zahlenwerte können aber auf Grund der Restabsorption von nicht gefällter DNA nur orientierenden Charakter haben.

Die Spezifitätswerte liegen für Nr.27 in der Größenordnung von ungefähr 0.6 - 0.3, zeigen also eine geringe AT-Spezifität an, die Affinitätswerte deuten nur auf schwache Bindungsneigung zu DNA hin. Sie liegen bei 1×10^4 für *M.luteus* und bei 4×10^4 für *B.subtilis*.

Erschwert wird die Bestimmung des Terephthalanilids zusätzlich durch seine sehr schlechte Löslichkeit.

Pentamidin zeigt α -Werte von ca. 0.3 - 0.4 und σ -Werte für *M.luteus* um 6×10^3 und für *B.subtilis* um 2×10^4 .

3.3. Gleichgewichtsdialyse von DAPI und Ethidium nebeneinander

Um zu sehen, inwieweit sich DAPI als postulierter, nicht interkalierender⁶⁸⁾, AT-spezifischer Ligand neben Ethidium, einem interkalierenden, relativ unspezifisch bindenden DNA-Liganden, an DNA anlagert, werden beide nebeneinander ins Gleichgewicht gesetzt und die resultierenden Bindungsdaten mit den simultan bestimmten Werten der Substanzen allein verglichen.

Da Ethidium sowohl bei 357 nm als auch bei 515 nm in SDS-haltiger Lösung absorbiert und bei den kurzwelligen Wellenlängen mit dem Maximum von DAPI interferiert, wird aus einer Reihe von Meßpunkten zwischen beiden Wellenlängen ein Quotient gebildet, der zur Korrektur verwendet werden soll. Der Mittelwert beträgt $F = \frac{O.D._{357}}{O.D._{515}} = 0,412$ aus zwölf Bestimmungen mit unterschiedlichen Konzentrationen. Mit diesem Faktor wird die Extinktion bei 515 nm des jeweiligen Kammerinhalts multipliziert und ergibt so die Extinktion an Ethidium bei 357 nm. Dieser Wert wird von der ermittelten Extinktion im DAPI-Maximum abgezogen, und man erhält so den Wert für DAPI allein.

Die Konzentration des Ethidium-Anteils kann ohne Störung durch DAPI bei 515 nm ermittelt werden.

Ergebnis:

DAPI-Werte	$\alpha = 0,06$	$\sigma_{ML} = 5,5 \times 10^4$	$\sigma_{BS} = 6 \times 10^5$
Ethidium-Werte	$\alpha = 1,67$	$\sigma_{ML} = 1,5 \times 10^5$	$\sigma_{BS} = 1 \times 10^5$

nebeneinander:

DAPI	$\alpha = 0,15$	$\sigma_{ML} = 4 \times 10^4$	$\sigma_{BS} = 2,4 \times 10^5$
Ethidium	$\alpha = 2,7$	$\sigma_{ML} = 2,7 \times 10^5$	$\sigma_{BS} = 1,2 \times 10^5$

Gegenüber den DAPI-Werten allein sinkt die AT-Spezifität in Gegenwart von Ethidium ab, was sowohl aus dem α -Wert,

als auch aus der Bindungsaffinität für *B.subtilis* hervorgeht. Andererseits steigt für Ethidium die GC-Spezifität erheblich an. In beiden Fällen bleiben die Affinitätskonstanten für *M.luteus* bzw. *B.subtilis* ziemlich gleich.

Das geänderte Bindungsverhalten beider Liganden könnte folgende Ursache haben:

DAPI besetzt auf Grund seiner AT-Spezifität bevorzugt AT-Paare, weniger dagegen GC-Paare. Ethidium ist hingegen nicht so wählerisch und reagiert mit beiden Basenpaaren. Durch die Besetzung der AT-Paare bleiben für Ethidium hauptsächlich nur noch die GC-Paare übrig, es resultiert der immense Anstieg der GC-Spezifität. Da Ethidium aber auch mit AT-Paaren reagiert, kann DAPI nur mit einem geringeren Anteil von Bindungspartnern in Wechselwirkung treten, so daß die AT-Spezifität deutlich zurückgeht.

Da DAPI das Ethidium in einem erheblichen Maße von AT-Paaren verdrängt, ohne seinerseits sehr stark von GC-Paaren verdrängt zu werden, scheint es eine wesentlich stärkere Bindung mit DNA einzugehen als Ethidium. In wieweit jedoch ein Interkalationsprozeß in die DAPI-Bindung integriert ist, oder ob lediglich eine Abschirmung des Ethidium der Grund für das veränderte Bindungsverhalten ist, kann nicht geklärt werden.

4. Diskussion

4.1. Spektrale Veränderungen

Ob zwischen einem Liganden und DNA eine Wechselwirkung stattfindet, zeigt sich meist in einer Verschiebung des Ligandenspektrums nach größeren Wellenlängen. Diese Verschiebung ist, ebenso wie der molare Extinktionskoeffizient des Liganden, vom jeweiligen Verhältnis r und der verwendeten DNA abhängig ²⁸⁾. Aus diesem Grund werden die quantitativen Bestimmungen der Liganden in 2,5%igem Na-dodecylsulfat-Milieu vorgenommen, das den Komplex zwischen DNA und Ligand zerstört ³⁰⁾. Ebenfalls wird zur Berechnung der Extinktionskoeffizient des Liganden in Gegenwart von 2,5% SDS herangezogen, da sich dieser durch den Zusatz erheblich verändern kann.

Diese Veränderungen seien am Beispiel DAPI verdeutlicht:

λ_{max}	r_{as}	ϵ_{max}
341,3	ohne DNA	33600
348,4	0,29	30300
343	1,2	32700
354,5	2,5% SDS	33700

Die bathochrome Verschiebung liegt in der Größenordnung von 10 nm.

4.2. Bindungsstudien

Die graphischen Darstellungen von r_{DNA}/m gegen r_{DNA} zeigen meist eine mehr oder weniger starke Abweichung von der Form einer Geraden, die durch die Scatchard-Gleichung gegeben ist. Diese Abweichung ist am ausgeprägtesten bei hohen r -Werten. Dieser Effekt kann damit erklärt werden, daß neben den primären Bindungsstellen eine zweite Klasse mit geringerer Affinität existiert ⁷⁵⁾, oder daß bei der höheren Ligandenkonzentration Außenauflagerungen stattfinden, sowie daß Antikooperativität durch "nearest neighbour exclusion" auftritt ⁶⁸⁾.

4.2.1. DNA-Affinität

Die DNA-Affinität der untersuchten Liganden ist entscheidend davon abhängig, ob basische Gruppierungen zur Verfügung stehen oder nicht. Beispiele hierfür liefern die Vergleiche von Nr.6 zu Nr.4, Nr.8 zu Nr.2, sowie Nr.7, Nr.10 und Nr.11 zu Nr.1 .

Dagegen hat der Ersatz des Indolstickstoffs durch isostere Atome auf die Affinität keinen bzw. nur geringen Einfluß, wie ein Vergleich der G -Werte für *M.luteus* von den Verbindungen Nr.1 bzw. Nr.2 mit Nr.3, Nr.4 und Nr.5 zeigt, großen Einfluß hat er jedoch auf die Spezifität. Die Einführung eines zweiten Stickstoffatoms in das Ringsystem, wie in Nr.52, bedingt eine verstärkte Wechselwirkung zwischen dem Liganden und dem polaren Lösungsmittel Wasser, wodurch die Bindungsaffinität absinkt ²⁹⁾.

Geringfügig nimmt die Affinität zu DNA ab, wenn der Phenylring in Nr.1 durch eine Vinylbrücke ersetzt wird (Nr.56), dagegen bringt die Verringerung des Abstands der beiden Amidinogruppen in Nr.55 eine größere Einbuße

mit sich. Daraus läßt sich folgern, daß auch die π -Elektronen der C=C-Doppelbindung und besonders des Phenylrings wesentlich zur Bindungsfestigkeit des Moleküls an DNA beitragen, ein Faktor, der in Gruppe C generell zu guten bis sehr guten, in Nr.37, dem hydrierten Analogen von Nr.34, wieder zum Absinken der Affinitäten führt.

Die hohen Affinitätswerte der Verbindung Nr.53 könnten mit einer optimalen Molekülgröße und einem günstigen Abstand der Amidinogruppen erklärt werden. Die Substitution der 3-Stellung des Indols mit mehr oder weniger sperrigen Gruppen bedingt einen Abfall der Affinität entsprechend der Größe des eingeführten Restes (Nr.14-19).

In der Reihe der Amidine mit einer Zwischenkette zwischen zwei Aromaten zeigen sich nur geringfügige Veränderungen der Affinität, was wohl anzeigt, daß sie alle nach dem gleichen Prinzip an DNA binden.

4.2.2. DNA-Spezifität

Der Ursprung der AT-Spezifität von DNA-Liganden läßt sich mit letzter Sicherheit nicht erklären. Gemeinsames Strukturmerkmal aller AT-spezifischen Liganden mit Affinitäten größer als 10^3 M^{-1} sind mindestens zwei basische Molekülanteile, die linear angeordnet sind und einen gewissen Mindestabstand haben ²⁸⁾.

Diese Voraussetzung trifft für die meisten der untersuchten Verbindungen zu. Die primäre, sicherlich unspezifische Fixierung der Liganden an DNA erfolgt über die kationische Gruppe und die anionischen Phosphatreste. Die zweite Bindungsart, die für die Spezifität verantwortlich sein dürfte, ist auf Wechselwirkungen mit Adenin und/oder Thymin zurückzuführen.

Indolderivate haben in der Regel eine höhere AT-Spezifi-

tät als isostere Analoge. Da Indol selbst nur eine sehr schwache Base darstellt, kann eine Protonierung des Ringstickstoffs ausgeschlossen werden. Eine mögliche protonierbare Stelle im Indolring ist Position 3, die die höchste Elektronendichte des Ringsystems darstellt ⁷⁶⁾.

Die Erhöhung der AT-Spezifität hat demzufolge ihre Ursache nicht in ionischen Wechselwirkungen zwischen der DNA und dem Liganden.

4.2.3. Ursachen der spezifischen Wechselwirkungen

Vorstellbar wäre eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Indol-NH und der freien Carbonylfunktion des Thymins bzw. dem N-3 des Adenins, Positionen, die beim Cytosin zur intramolekularen H-Brückenbindung zu Guanin verwendet werden, bzw. die wie im Guanin sterisch abgeschirmt sind.

4.2.4. AT-Spezifität im Vergleich zur Hemmwirkung auf Nucleinsäurepolymerasen

Wesentliche Aussagen können aus den Hemmungen verschiedener DNA- und RNA-Polymerasen erhalten werden, besonders, wenn dabei AT-reiche Sequenzen der Polynucleotidkette blockiert werden.

Mit dem synthetischen Polymeren poly d (A-T) als Matrizenprimer und DAPI als Inhibitor wird sowohl die DNA-Polymerase α , β und γ , als auch eine Reverse-Transcriptase blockiert ⁷⁷⁾.

Systematisch hat E. De Clercq ⁷⁸⁾ die Inhibition der Reverse-Transcriptase mit endogener viraler RNA aus Leukämieviren als natürlicher Matrize und einer Reihe von biskationischen Verbindungen untersucht.

Ein Vergleich der I.D.50-Werte (inhibitorische Dosis) mit dem Spezifitätsparameter α des Verteilungssystems zwischen bakteriellen DNAs zeigt, daß besonders AT-spezifische Liganden wie Nr.1, Nr.2, Nr.20, Nr.40, Nr.42 und Nr.48 keine besondere Inhibition der Reverse-Transcriptase aufweisen, relativ unspezifisch oder zumindest nicht ausgeprägt AT-spezifisch bindende Liganden dagegen überaus starke Hemmstoffe für dieses Enzym darstellen, z.B. Nr.3, Nr.29, Nr.31, Nr.32, Nr.45, Nr.49 und Ethidium. Dies dürfte aber daran liegen, daß die natürliche Matrize keine Basenzusammensetzung hat, die eine Bevorzugung für AT-Paare mit sich bringt, sondern hier nur Liganden aktiv sind, die eine besonders feste Bindung mit der Nucleinsäure eingehen.

Tabelle 3

Beziehungen zwischen der AT-spezifischen Bindung von Liganden und ihrer Hemmwirkung auf die Reverse-Transcriptase aus Leukämieviren.

a)	Substr.Nr.	α	I.D.50 ⁷⁸⁾
	1	0,05	5
	2	0,06	6
	20	0,12	11
	40	0,05	3-250
	42	0,06	6
	48	0,12	6
b)	3	0,60	1,2
	29	0,20	0,9
	32	0,45	1,1
	34	~ 0,3	1,1
	49	0,32	0,9
	Ethidium	> 1,0	1,2
	45	0,2-0,5	1,4
	31	0,2-0,3	1,3

4.2.5. Bindungsmechanismus biskationischer Liganden

Für DAPI (Nr.1) sind zahlreiche Untersuchungen vorgenommen worden, doch geben sie alle keinen Aufschluß über den wahren Bindungsmechanismus. Gemeinsame Aussage ist jedoch, daß es mindestens in zwei unterschiedlichen Weisen an DNA bindet. P. C h a n d r a et al ⁷⁹⁾ kommen auf Grund von Untersuchungen mit UV-Absorptionsspektroskopie, Mikrokalorimetrie und Affinitätschromatographie zu dem Ergebnis, daß DAPI, abhängig vom jeweiligen Verhältnis DAPI zu DNA, drei verschiedene Bindungsarten mit DNA eingehen kann, und daß in einem Verhältnis r von 0.05 - 0.15 eine Interkalation wahrscheinlich sein soll.

A. B i e r z y n s k i et al ⁸⁰⁾ haben mittels Fluoreszenzmessungen für Kalbsthymus-DNA eine Bindungskonstante von 10^6 ermittelt und postulieren mindestens zwei AT-Paare als Bindungsstellen für ein DAPI-Molekül. Auf Grund der Ähnlichkeit mit Hydroxystilbamidin (2-Hydroxy-4,4'-diamidinostilben) in gelelektrophoretischen Untersuchungen mit PM 2 DNA wird postuliert ⁸¹⁾, daß DAPI nicht interkaliert, aber dennoch in zweierlei Weise mit DNA sich bindet, was auch mit der Schmelzanalyse von DAPI-beladener DNA in Einklang steht ⁸¹⁾.

DAPI inhibiert im Konzentrationsverhältnis DAPI/DNA = 0.5 das Restriktionsenzym ECoRI, das spezifisch Hexanucleotidsequenzen folgendermaßen schneidet

G	A	A	T	T	C
C	T	T	A	A	G

⁸²⁾
In niedrigeren Dosen stimuliert es das Enzym. Daraus folgen die Autoren ⁸¹⁾ eine AT-spezifische Blockade, die nicht nur mit DAPI, sondern auch mit DIPI (Nr.2), Thionaphthenanalogen (ähnlich Nr.3) und Nr.40 stattfindet, jedoch nicht mit dem DAPI-Analogen 5-Amidino-2-(4-amidinophenyl)-indol und dem 5,5-Amidinobisbenzofuran Nr.31. Eine AT-Spezifität könnte demnach auch aus sterischen

Gründen zustande kommen, indem z.B. eine 5-Amidinogruppe eine Anlagerung an AT-Paare verhindert.

J. K a p u ś c i ń s k i et al ⁸³⁾ untersuchten die Einflüsse von pH, Viskosität, Ionenstärke etc. auf die optischen und Fluoreszenzeigenschaften von DAPI-DNA-Komplexen und kommen zu dem Schluß, daß es interkalieren soll.

Licht in den Bindungsmechanismus von stark kationischen Verbindungen mit einem planaren Molekülanteil bringt die Gleichgewichtsdialyse von DAPI neben Ethidium nicht. Sie zeigt lediglich, daß die GC-Spezifität von Ethidium wesentlich mehr verstärkt wird als die AT-Spezifität von DAPI. Daraus kann man folgern, daß DAPI viel stärker an DNA gebunden wird, was im Einklang mit den Ergebnissen von I. K a n i a et al ⁸²⁾ und D. H. W i l l i a m s o n et al ⁶⁶⁾ steht.

DAPI könnte sich auf Grund seiner Molekülgröße leicht in der großen Rinne der DNA anlagern. Hinweise darauf geben die Untersuchungen von M. S. L i n et al ⁸⁴⁾

über das Fluoreszenzverhalten von DAPI und verschiedenen DNAs und Polynucleotiden. Dabei wird die Fluoreszenz des DAPI-DNA-Komplexes merklich gelöscht, wenn in die DNA oder das Polynucleotid das Thymin-Analoge 5-Bromdesoxyuridin eingebaut wurde. Das Bromatom muß dabei in die große Rinne der DNA-Doppelhelix ragen ⁸⁵⁾.

In Analogie zu H-33258, das in der großen Rinne der Helix gebunden werden soll, und dessen Fluoreszenz ebenfalls stark gelöscht wird ⁸⁶⁾, könnte DAPI hier gebunden werden.

Aufschluß über den Bindungsmechanismus könnte sicherlich die Methode von M. W a r i n g ¹²⁾ geben, wobei der Einfluß von Liganden auf die Sedimentationskoeffizienten untersucht wird.

4.2.6. DNA-Bindung und wachstumshemmende Fähigkeiten bei pro- und eukaryontischen Mikroorganismen

Die Untersuchungen von J. A n n é ⁸⁷⁾ gestatten einen Vergleich der in vitro an isolierter bakterieller DNA ermittelten Bindungsdaten mit der Hemmwirkung der kationischen Substanzen auf das Wachstum verschiedener pro- und eukaryontischer Mikroorganismen.

In Tabelle 4 sind die wachstumshemmenden Aktivitäten und das Bindungsverhalten an DNA für eine Reihe von Substanzen gegenübergestellt.

Dabei zeigt sich, daß Verbindungen, die gut und AT-spezifisch an DNA binden, antibakterielle und fungistatische Eigenschaften besitzen (Nr.1, Nr.2, Nr.20, Nr.29, Nr.36, Nr.39, Nr.40, Nr.42, Nr.48, Nr.50), während Substanzen, die schlecht an DNA binden, keine nennenswerte Hemmwirkung zeigen (Nr.3, Nr.4, Nr.27, Nr.32). Daneben gibt es aber Liganden, die weniger spezifisch an DNA binden, aber dennoch gute wachstumshemmende Wirkungen aufweisen, Nr.26, Nr.31, Nr.34, Nr.45, Nr.49.

Besonders auffällig ist, daß die Art der basischen Flanke, sowie die des Heteroatoms im zentralen Ringsystem einen entscheidenden Einfluß auf die wachstumshemmenden Eigenschaften der Verbindungen haben. Dabei geht der isostere Ersatz des Indol-NH gegen Schwefel oder Sauerstoff mit einer verschlechterten Hemmwirkung einher, in völliger Übereinstimmung mit den Bindungsdaten an isolierter DNA (Nr.3, Nr.4). Dagegen erweisen sich die Hemmwerte der Verbindungen mit Amidino- gegenüber denen mit Imidazolinygruppen bei den antibakteriellen und fungistatischen Versuchen meistens als besser, eine Beobachtung, die in diesem Ausmaß bei der DNA-Bindung nicht gemacht wurde (Nr.1, Nr.2; Nr.31, Nr.32).

Tabelle 4

Beziehungen zwischen wachstumshemmender Aktivität ⁸⁷⁾
und Bindungsverhalten an DNA

Subst.Nr. Bindungskonst. α antibakt. fungistat.
-K x 10⁶ Wirksamkeit

1	5	0,05	+++	++++
2	2,5	0,06	++	++(+)
20	3,3	0,12	++(+)	+++
29	1,2	0,20	-	+++
36	1,1	0,20	++	++
39	5,4	0,17	+++++	++++
40	4,2	0,05	++++	+++++
42	2,6	0,06	++	++++
48	3	0,12	+++	++++
50	0,9	0,14	-	++
3	0,5	0,60	-	-
4	0,3	0,33	-	-
27	?	~0,3	-	-
32	?	0,45	-	-
55	0,7	0,10	-	-
26	?	0,3	++(+)	++(+)
31	0,7	0,20	++	+++
34	5,4	0,43	+	+(+)
45	?	0,3	++++	+(+)
49	0,3	0,32	++(+)	+++(+)

sehr gute Hemmung mit breitem Spektrum: +++++

einzelne Stämme nicht sensitiv: +++++

gute Hemmung: +++

mäßige Hemmung: ++

einzelne Stämme sensitiv: +

einzelne Stämme nur gegen Dosen >30

< 60 µg/ml sensitiv: (+)

unwirksam: -

Phenoxyerweiterte Strukturen (Nr.39, Nr.40, Nr.42) zeigen die besten Wachstumshemmungen in pro- und eukaryontischen Systemen, wohingegen bei einer Molekülverkleinerung eine starke Einbuße der Wirksamkeit auftritt (Nr.55).

Die im Testsystem von J. A n n é ⁸⁷⁾ eingesetzten sensiblen Bakterien weisen in ihrer DNA einen relativ hohen AT-Basengehalt auf, der von 65 % AT für *Streptococcus faecalis* ³⁵⁾ bis zu 50 % AT für *E.coli* ³⁵⁾ reicht, und nur *Pseudomonas aeruginosa* mit 33 % AT ³⁵⁾ erwies sich gegen alle untersuchten Substanzen als unempfindlich. Dies läßt den Schluß zu, daß die kationischen Verbindungen direkt mit der DNA der Erreger reagieren könnten.

Neben den antibakteriellen und fungistatischen Eigenschaften besitzen einige Verbindungen noch gute antileukämische ⁸⁸⁾ Aktivität (Nr.29, Nr.31, Nr.32, Nr.49).

4.2.7. DNA-Bindung und trypanocide Aktivitäten

Da sich die rinderpathogenen Trypanosomenarten *T.congolense* und *T.vivax* morphologisch und entwicklungsmäßig von den menschenpathogenen Formen *T.brucei gambiense* und *T.brucei rhodesiense* unterscheiden, ist es nicht verwunderlich, daß Chemotherapeutika bei beiden Arten unterschiedliche Wirkungen zeigen. Dabei fällt auf, daß alle gegen rinderpathogene Trypanosomiasen wirksamen Verbindungen auch gegen die Erreger der menschlichen Schlafkrankheit wirken, nicht jedoch umgekehrt.

Dies liegt einmal in den Erregern selbst, zum anderen in dem unterschiedlichen Wirkungsmechanismus der Verbindungen begründet. *T. congolense* und *vivax* sind ausgesprochene Plasmaparasiten, während *T.rhodesiense* und andere der *brucei*-Gruppe sich über weite Teile des Wirtsorganismus verteilen und sich in Gewebe und Körperflüs-

sigkeiten bis hin zur Zerebrospinalflüssigkeit anreichern. Bei letzteren muß zweifellos beim Durchwandern der Blutgefäßwände eine Proteinolyse stattfinden.

Als Wirkungsmechanismus der trypanociden Diamidine und Diimidazoline wird eine Bindung an die AT-reiche K-DNA angenommen. Dies betrifft vor allem die Trypanosomen aus der Blutbahn, also die rinderpathogenen. Daneben ist für die Diamidine bekannt, daß sie Arginin- und Lysin-spezifische Serin-Proteinasen inhibieren (65,89).

Die Kombination beider Effekte ist für die Wirksamkeit gegen menschenpathogene Trypanosomen von Bedeutung, wohingegen die Wirkung gegen die congolense und vivax-Arten nur auf eine Reaktion mit der DNA zurückzuführen sein dürfte.

Aus der folgenden Tabelle, in der die congolense-Aktivität und AT-Spezifität aufgezeigt ist, geht diese Korrelation hervor.

Tabelle 5.1

Beziehungen zwischen AT-Spezifität der untersuchten Substanzen und ihrer Wirksamkeit gegen *Trypanosoma congolense* und *vivax* in der Maus

Subst.Nr.	Spezifitäts- parameter α	DCM a)			
		<i>T.congolense</i>	ref.	<i>T.vivax</i>	ref.
1	0,06	3-10	121	3	122
14	0,15	<10	122	<10	122
15	0,14	<10	122	<10	122
17	0,13	10	122	10	122
20	0,12	7-14	121	5 ^{b)}	122
21	0,12	10	123	-	-
22	0,12	10	123	-	-
23	0,085	1 ^{b)}	122	unwirks.	122
39	0,17	3	123	-	-
40	0,05	14 ^{c)}	121	-	-
44	0,17	-	-	5	122
48	0,12	~10	123	-	-
50	0,14	10	122	<10	122
53	0,03	1 ^{b)}	122	>10 ^{b)}	122
54	0,08	10	122	10	122
55	0,10	>10 ^{b)}	122	<10/0,1 ^{b)}	122
56	0,17	3-30 ^{b)}	122	2 ^{b)}	122

a) DCM = Dosis curativa minima in mg/kg Körpergewicht

b) Mittlere effektive Dosis in mg/kg Körpergewicht

c) Rezidiv Dosis

- = nicht getestet

Tabelle 5.2

Subst.Nr.	Spezifitäts- parameter α	T.congolense	DCM ^{a)}		
			ref.	T.vivax	ref.
3	0,60	>10	123	-	-
4	0,33	>100	123	-	-
12	0,70	unwirks.	122	unwirks.	122
13	0,75	-	-	unwirks.	122
16	0,27	< 60 ^{b)}	122	< 50	122
19	~1,0	< 50 >100	122	> 50 ^{b)}	122
24	0,35	-	-	30	122
30	-	< 30	122	-	-
31	0,2-0,3	>100	121	-	-
32	0,45	>100	123	-	-
33	0,31	unwirks.	122	-	-
35	0,35	30	123	-	-
37	0,61	≥ 30	123	-	-
51	0,47	-	-	30-40 ^{b)}	122
52	0,55	>30	123	-	-
Ausnahmen:					
2	0,06	> 30	123	-	-
Samorin ^R	0,67	-	-	< 0,05 ^{b)}	122
Anthrycide ^R	1,1	-	-	1 ^{b)}	122

5. Gleichgewichtsdialyse mit Trypanosomen-DNA

Die Verbindung Nr.1 wurde nach der bei Bakterien-DNA beschriebenen Methode mit den Desoxyribonucleinsäuren aus *Trypanosoma rhodesiense* bestimmt. Die DNA-Lösungen waren

- 1) chromosomale DNA (52 % AT)
- 2) Kinetoplasten-DNA (69,4 % AT).

Die graphischen Darstellungen zeigt Abbildung Nr.8. Sie geben die aus den Versuchen mit Bakterien-DNA erwartete starke Bindung der Substanz an die Trypanosomen-DNA wieder. Direkt vergleichbar sind die Bindungsparameter für die chromosomale Trypanosomen-DNA und *B.subtilis*-DNA, die sich im AT-Gehalt nur geringfügig unterscheiden. Für beide ergeben sich $\bar{G}$ -Werte von ca. 5×10^5 und apparente Bindungskonstanten von ca. 5×10^6 .

Für die Kinetoplasten-DNA, deren AT-Gehalt noch über dem von *Clostridium acidurici*-DNA liegt, konnten nur Bindungsparameter ermittelt werden, die unter den Werten für diese DNA liegen. Dies könnte einmal in der niedrigen Konzentration der eingesetzten DNA-Lösung liegen, was frühzeitige meßtechnische Grenzen setzt, oder an der DNA-Präparationsmethode, so daß sie z.T. nicht mehr in nativer Form vorlag. Andererseits könnte natürlich auch die zirkuläre Natur der Kinetoplasten-DNA eine andere Affinität zu dem Liganden zeigen. Der gefundene Affinitätsparameter von fast 10^6 deutet jedoch an, daß eine dem AT-Gehalt entsprechende sehr starke Komplexbildung zwischen der DNA und dem Liganden stattfindet.

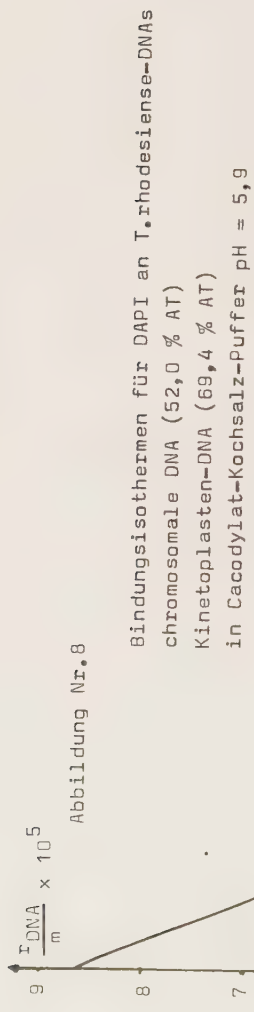


Abbildung Nr. 8

$\sigma_{kin} = 9 \times 10^5$
 $K_{app} = 7,2 \times 10^6$
 $B_{app} = 0,1$
 $n = 10$

$\sigma_{chrom} = 6 \times 10^5$
 $K_{app} = 5,0 \times 10^6$
 $B_{app} = 0,1$
 $n = 10$

I_{DNA}

B. Experimenteller Teil

1. Allgemeine Angaben Über Materialien

Alle Reagenzien wurden in p.a.-Qualität oder in der höchsten handelsüblichen Reinheitsform verwendet. Spezielle Substanzen sind mit Hersteller-Nr. angegeben. Als Lösungsmittel diente zweifach destilliertes Wasser.

Die Reinigung von Glasgeräten und Dialysierzellen erfolgte zuerst in Extran^Rsauer Merck und nach dreimaligem Zwischenspülen mit Wasser in Extran^Ralkalisch. Anschließend wurde mindestens fünfmal mit Leitungswasser und dreimal mit destilliertem Wasser gespült.

Pufferlösungen wurden gegen Standard-Pufferlösung eingestellt.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer, soweit nicht in den speziellen Arbeitsvorschriften vermerkt:

BPE	: 0,01 m Natriumphosphat (NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 nach dem jeweiligen pH-Wert), 0,001 m EDTA
BPES	: BPE + 0,18 m NaCl
CS	: 0,03 m Natriumcacodylat 0,05 m Cacodylsäure 0,18 m NaCl, pH = 5,9
SDS	: 25 % w/w Natrium-dodecylsulfat
SSC	: 0,15 m NaCl, 0,015 Natriumcitrat, pH = 7,0
EDTA-NaCl-	
Lösung	: 0,1 m EDTA, 0,15 m NaCl, pH = 8,2
TES	: 0,05 m Trishydroxymethylaminomethan 0,01 m EDTA 0,01 m NaCl, pH = 8,0

2. Bakterien

2.1. Aufzucht

Zusammensetzung des Kulturmediums ⁶⁸⁾:

Difco-yeast-Extrakt	3,0 g
$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	1,0 g
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	0,5 g
Spurensalz-Lösung	1,0 ml
H_2O	ad 1000,0 ml

Glucose 10 g /1000,0 ml Medium

Spurensalz-Lösung:

$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	11,0 g
$MnSO_4 \times 1 H_2O$	6,0 g
$FeSO_4 \times 7 H_2O$	1,0 g
$CoSO_4 \times 7 H_2O$	0,3 g
$CuSO_4 \times 5 H_2O$	0,04 g
H_3BO_3	0,06 g
KI	0,001g
EDTA (II)	5,0 g
H_2O	ad 1000,0 ml

Das in Wasser gelöste Kulturmedium wird mit H_3PO_4 auf einen pH von 6,9 eingestellt und im Autoklaven sterilisiert. Dann werden 10 g separat sterilisierter Glucose pro Liter Medium zugesetzt. Die Vorkulturen werden auf Agar-Platten und dann auf 1 l - Keimkolben durchgeführt und die Kultur anschließend in einen 20 l - Fermenter weitergeführt. Nach 2-4 Tagen werden die Bakterien in der log-Phase geerntet mit Ausbeuten zwischen 37 und 120 g pro 20 l - Ansatz und eingefroren. Wachstumstemperatur: 30° C. Diese Aufzuchtsmethode eignet sich sowohl für *M.luteus* als auch für *B.subtilis* und *Cl. aciduri*, obwohl für erstere 4 Tage Wachstum benö-

tigt werden.

Wegen dieses sehr langen Wachstums wird mit einem Verdünnungstest auf Agar-Platten überprüft, ob fremde Keime eingeschleppt wurden. Nach 4 Tagen Brutzeit bei 37° C dürfen nur rein gelbe *M.luteus* auftreten.

Herrn L. H o f f m a n n, Institut für Physiologische Chemie, danke ich recht herzlich für die Durchführung der Bakterienaufzucht.

2.2. DNA-Isolierung

2.2.1. Isolation von Bakterien-DNA aus *B.subtilis*, *E.coli* und Clostridienarten ^{29,68,90)}

20-25 g tiefgefrorene Zellen werden in 400 ml SSC-Puffer suspendiert und anschließend bei 4000 UpM bei 4° C 5 Minuten zentrifugiert. Die gewaschenen Bakterienzellen werden in 450 ml SSC-Puffer suspendiert, in eine verschraubbare Glasflasche übergeführt, auf 37° C im Wasserbad erwärmt und mit 250 mg Lysozym Merck Nr. 5281, gelöst in 5 ml SSC, 5 Minuten inkubiert. Die Mischung wird mit 25 %iger SDS-Lösung auf 0,5 % eingestellt und im Wasserbad schnell auf 65° C erwärmt und 10 Minuten bei dieser Temperatur unter gelegentlichem Umschütteln belassen. Danach läßt man unter der Kaltwasserleitung schnell auf 55° C abkühlen, stellt mit 0,5 m Phosphatpuffer auf pH = 7 ein und inkubiert unter ständigem Rühren mit 0,1 g Proteinase K Merck Nr. 24568, gelöst in 5 ml SSC, 15-20 Minuten bei 50° C.

Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird mit 5 ml

Natriumperchloratlösung auf 1 m Perchlorat eingestellt und nach dem Durchmischen mit dem gleichen Volumen iso-Amylalkohol + Chloroform 1 + 24 während 20 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt. Danach wird 20 Minuten lang bei 9000 UpM zentrifugiert, die obere, klare, wässrige Phase abgehoben und mit dem gleichen Volumen eiskalten Ethanol überschichtet und die Nucleinsäuren durch Vermischen ausgefällt.

Die Nucleinsäuren werden in 100 ml BPE pH = 7,0 gelöst und mit 10 mg RNase Merck Nr. 24570, welche vorher in 10 ml BPE gelöst, 10 Minuten zum Sieden erhitzt und langsam abgekühlt wurde, sowie mit 10 mg Amylase Merck Nr. 24507 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird mit festem Natriumperchlorat auf 5 m eingestellt und die kalte Lösung sofort mit dem doppelten Volumen eisgekühlten Ethanol überschichtet und die DNA ausgefällt. Die DNA wird in 10 ml BPE pH = 7,0 gelöst, mit 10 ml 1,8 m NaCl versetzt und mit 5 mg Proteinase K 4 Std. bei 50° C inkubiert.

Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird dreimal mit dem gleichen Volumen Phenol je 20 Minuten geschüttelt, 20 Minuten bei 9000 UpM zentrifugiert und die obere, wässrige Phase abgehoben und nach der letzten Extraktion mit dem doppelten Volumen Ethanol gefällt.

Das verwendete Phenol wird vor Gebrauch im Vakuum destilliert und mit 0,2 m Phosphatpuffer gesättigt, bis die Phenolphase einen pH von 7,0 erreicht hat.

Die DNA wird in 45 ml BPE gelöst, mit 5 ml 3 m Natriumacetatlösung auf 0,3 m eingestellt und mit dem 0,54-fachen Volumen iso-Propanol ausgefällt. Das Präzipitat wird in 45 ml BPE gelöst, mit 5 ml NaCl 1,8 m versetzt und gegen BPES pH = 7,0 dialysiert (Visking Dialyserschlauch aus regenerierter Cellulose) bis die Extinktion

des Puffers < 0.05 bei 260 nm ist.

Ausbeute: 30-60 mg DNA aus 20 g gefrorener Zellen.

2.2.2. DNA aus *Micrococcus luteus* ^{68,30)}

Bis zur ersten Ethanol-fällung wird analog 2.2.1. verfahren, nur daß statt SSC-Puffer in EDTA-NaCl-Lösung pH = 8,2 gearbeitet wird.

Die ausgefällten Nucleinsäuren werden in 112 ml BPE gelöst, mit einigen Tropfen wässriger Toluidinblau-Lösung versetzt und mit 117,5 g CsCl auf eine Dichte von ca. 1,70 g/cm³ eingestellt. Die Lösung wird in Zentrifugenröhrchen gefüllt, mit Paraffin überschichtet und fest verschlossen 40 Std. bei 45000 UpM und 15° C in der präparativen Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die hochviskose, durch den Farbstoff blau gefärbte DNA-Zone ist gut von dem RNA-Sediment getrennt und kann leicht aus dem Röhrchen nach dem Abhebern des Überstandes entnommen werden. Die DNA wird in 60 ml BPE gelöst und 20 Minuten mit dem gleichen Volumen iso-Amylalkohol + Chloroform 1 + 24 geschüttelt und dann bei 9000 UpM 20 Minuten lang zentrifugiert.

Die wässrige, DNA-haltige Phase wird mit dem gleichen Volumen Ethanol gefällt, in 90 ml BPE gelöst und mit 3 m Natriumacetatlösung auf 0,3 m eingestellt. Die DNA wird dann mit dem 0,54-fachen Volumen iso-Propanol gefällt, in 45 ml BPE gelöst, mit 5 ml 1,8 m NaCl versetzt und gegen BPES dialysiert.

2.3. Qualitätskontrolle und Charakterisierung der DNA

2.3.1. Gehaltsbestimmung

Der DNA-Gehalt in Pufferlösungen wurde mit einem Spektralphotometer DMR 21 der Firma Zeiss bestimmt. Dazu wurden die Extinktionskoeffizienten von G. F e l s e n - f e l d und S. Z. H i r s c h m a n n ⁹¹⁾ bei 260 nm verwendet:

M.luteus-DNA	6923 cm ² /Mol Nucleotidphosphat
B.subtilis-DNA	6412 cm ² /Mol Nucleotidphosphat
Cl.acidi-urici-DNA	6225 cm ² /Mol Nucleotidphosphat
T.rhodesiense-DNA	6620 cm ² /Mol Nucleotidphosphat
	(angenommen)

2.3.2. Alkalische Hyperchromie

Zu einer DNA-Lösung in BPES-Puffer pH = 7.0 wird 5 m NaOH bis zu einer Endkonzentration von 0.5 m zugegeben. Der Anstieg der UV-Absorption im Maximum wird gemessen. Die Absorptionswerte der nativen DNA müssen mindestens um folgende Prozentwerte überstiegen werden ²⁹⁾:

M.luteus	25,3 %
B.subtilis	27,5 - 29 %
Cl.acidi-urici	30,5 %

2.3.3. Überprüfung des einheitlichen Molekulargewichts

Dialysierte DNA wird über Sepharose^R Cl-6B-Gel chromatographiert und das Eluat kontinuierlich mittels einer Durchflußzelle spektralphotometrisch bei 260 nm vermessen und gesammelt. Für Bindungsexperimente wird nur die einheitliche erste hochmolekulare Fraktion verwendet.

2.3.4. Analytische Ultrazentrifugation

DNA-Proben mit einem Gehalt von ca. 50 µg/ml werden mit einer DNA-Lösung bekannter Schwebedichte (Referenz) versetzt und mit CsCl auf eine Dichte von ca. 1,71 g/cm³ eingestellt. Dieser Ansatz wird in Zentrifugenzellen gefüllt und 48 Std. bei 25° C und 44000 UpM im Vakuum in einer Beckmann Model E Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Gerät ist mit einer UV-Optik ausgerüstet, die es gestattet, die Ausbildung des CsCl-Gradienten und die Auftrennung der DNA zu registrieren.

Aus der Schreiberkurve läßt sich mit Hilfe der Schwebedichte der Referenz-DNA, der Winkelgeschwindigkeit ω , und der Entfernung x des DNA-Peaks von der Rotorachse unter Berücksichtigung des Vergrößerungsfaktors des Schreibers und der Gerätekonstanten $\beta = 1,2 \times 10^6$ für $1,4 \leq \rho \leq 1,8$ g/cm³ die Schwebedichte der untersuchten DNA nach folgender Formel berechnen^{92,93}):

$$\rho_{\text{Probe}} = \rho_{\text{Ref}} + \frac{\omega^2}{2\beta} (x_{\text{Probe}}^2 - x_{\text{Ref}}^2)$$

Aus der errechneten Schwebedichte lassen sich mit der folgenden Formel³⁵) die Prozent GC der DNA errechnen:

$$\rho = 0,098 \cdot (\text{GC}) + 1,660 \text{ g/cm}^3$$

Frau Dr. H. H e i l m a n n, Institut für Mikrobiologie, danke ich recht herzlich für die Durchführung der analytischen UZ-Läufe und für viele fruchtbare Diskussionen.

2.4. Gleichgewichtsdialyse

Spezifitätsbestimmungen ²⁹⁾

Die mittlere Kammer einer dreiteiligen Dialyseapparatur wird mit einer Lösung eines Liganden in Puffer gefüllt. Dieser verteilt sich zwischen den beiden DNA-Lösungen in den äußeren Kammern entsprechend seiner Basenspezifität. Die DNA-Lösungen haben etwa gleiche Konzentration, aber verschiedene Basenzusammensetzung.

Die normale Anordnung ist folgendermaßen:

Eine der äußeren Kammern ist mit *M.luteus*-, die andere mit *B.subtilis*-DNA gefüllt, mit jeweils einer Konzentration von ca. 100 µg/ml. In der mittleren Kammer befindet sich die Ligandenlösung je nach Extinktionskoeffizient in Konzentrationen von 10^{-4} bis 2×10^{-5} m, bzw. bei niedriger Beladung in Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-7} m. Nach 48stündiger Gleichgewichtseinstellung wird aus jedem Kompartiment eine Probe entnommen und mit 10 % SDS-Lösung (25%) versetzt, was den DNA-Ligand-Komplex zerstört ³⁰⁾.

Die Konzentration in den einzelnen Kammern wird wie folgt bestimmt:

Mittlere Kammer $\hat{=}$ freie, überall vorhandene Ligandenkonzentration gegen Puffer und SDS.

DNA-haltige Kammern $\hat{=}$ DNA-gebundene Ligandenkonzentration gegen den freien Anteil von Messung 1.

Jede Zelle wird entweder wieder mit Puffer oder steigender Ligandenkonzentration, sowie DNA gefüllt und wieder äquilibriert. Auf diese Weise nimmt der Gehalt an Ligand entweder zu oder ab und eine Reihe von Konzentrationsmeßwerten wird erhalten. Siehe Anhang mit Berechnungs- und Auswertungsbeispiel.

2.5. Auswertung

Man erhält bei einer bestimmten nichtgebundenen Ligandenkonzentration m unterschiedliche Konzentrationen des an AT-reiche bzw. an GC-reiche DNA gebundenen Liganden. Der Anteil des an GC-reiche DNA gebundenen Liganden sei $r_{\text{DNA I}}$, des an AT-reiche gebundenen $r_{\text{DNA II}}$. Der Wert von r kann aus der gemessenen Ligandenkonzentration und der bekannten DNA-Konzentration berechnet werden ⁹⁴⁾:

$$r = \frac{c_{\text{BL}}}{c_{\text{Bo}}} = \frac{c_{\text{BL}}}{c_{\text{B}} + c_{\text{BL}}}$$

wobei c_{BL} = Konzentration des Biopolymer-Ligand-Komplexes, c_{Bo} = Gesamtkonzentration des Biopolymeren und c_{B} = Konzentration des nicht gebundenen Biopolymeren.

2.5.1. Bestimmung der DNA-Spezifität

Die Spezifität eines Liganden ²⁹⁾ ergibt sich aus dem Verhältnis α' der an die beiden verwendeten DNAs gebundenen Anteile

$$\alpha' = \frac{r_{\text{DNA I}}}{r_{\text{DNA II}}} .$$

Mit Hilfe der oben beschriebenen Meßanordnung erhält man so eine Reihe von α' -Werten entweder mit steigendem oder mit fallendem r .

Die graphische Darstellung von α' gegen r für die stärker bindende (AT-reiche) DNA ergibt mit $\alpha = \lim_{r \rightarrow 0} \alpha'$ den

Spezifitätsparameter α . Die Ermittlung von α bringt den Vorteil mit sich, daß es die Eigenschaften eines isolierten Ligandenmoleküls ($r = 0$ bzw. $c_{\text{BL}} \ll c_{\text{Bo}}$!) repräsentiert, ohne die Komplikationen der Einschränkung der Bindungsstellen auf der DNA durch Nachbarschaftsausschlüsse ²⁹⁾.

2.5.2. Bestimmung der Bindungsaffinität

Aus der Gleichgewichtsbeziehung 15,29,94)

Ligand + Biopolymer $\rightleftharpoons$ Ligand • Biopolymer,
die für Biopolymere mit einer Bindungsstelle gilt, folgt
nach dem MWG:

$$K = \frac{c(\text{Lig} \cdot \text{Biopol})}{c_{\text{Lig}} \cdot c_{\text{Biopol}}} \quad \text{bzw.} \quad K = \frac{c_{\text{BL}}}{m \cdot c_{\text{B}}} \quad (1)$$

wobei K die Bindungs-(=Gleichgewichts-)konstante ist und
 c_{BL} , m und c_{B} die Bedeutung haben wie oben beschrieben.
Aus (1) folgt durch Umformung:

$$c_{\text{BL}} = K \cdot m \cdot c_{\text{B}}$$

Setzt man sie in die Gleichung von S.69 ein, wo gilt,

$$\text{daß } r = \frac{c_{\text{BL}}}{c_{\text{B}} + c_{\text{BL}}} \quad \text{ist, so folgt:}$$

$$r = \frac{K \cdot m \cdot c_{\text{B}}}{c_{\text{B}} + K \cdot m \cdot c_{\text{B}}} \quad \text{oder} \quad r = \frac{K \cdot m}{1 + K \cdot m}$$

Umformung ergibt:

$$r(1 + K \cdot m) = K \cdot m; \quad r + r \cdot K \cdot m = K \cdot m$$

$$\frac{r}{m} = K - r \cdot K \quad \text{oder} \quad \frac{r}{m} = K(1 - r)$$

Hat ein Biopolymeres mehr als eine Bindungsstelle, so gilt:

$$\frac{r}{m} = K_{\text{app}}(B_{\text{app}} - r)$$

mit K_{app} = apparenter Bindungskonstante und B_{app} = appa-
renter Anzahl von Bindungspunkten.

Die graphische Darstellung von $\frac{r}{m}$ gegen r, die als
Scatchard Diagramm ⁷¹⁾ bezeichnet wird, ergibt eine Ge-
rade. Aus dem Abszissenabschnitt läßt sich die Anzahl der
Bindungspunkte n ermitteln. Aus dem Ordinatenabschnitt
kann man den Affinitätsparameter ϕ extrapolieren, wobei
 K_i die Bindungskonstante und B_i die Bindungsplätze dar-
stellen.

Der Affinitätsparameter $\bar{\alpha}$ ist durch folgende Beziehung definiert:

$$\lim_{r \rightarrow 0} \frac{r}{m} = \sum_i K_i \cdot B_i = \bar{\alpha}$$

In die Spezifitätsgleichung $\alpha = \lim_{r \rightarrow 0} \frac{r_{\text{DNA I}}}{r_{\text{DNA II}}}$ eingesetzt, folgt:

$$\alpha = \frac{\bar{\alpha}_{\text{DNA I}}}{\bar{\alpha}_{\text{DNA II}}}$$

Das heißt, die DNA-Spezifität α eines Liganden ist der Quotient seiner Affinitäten zu den beiden DNAs.

Im Falle von DNA als Biopolymeren bedeutet B_i die Anzahl der Bindungsstellen pro Basenpaar ²⁸⁾.

Sie ergibt sich bei nicht interkalierenden Liganden, bei denen die DNA-Ligand-Bindung von außen erfolgt, aus dem Prozentgehalt der DNA an AT, da jedes Basenpaar eine mögliche Bindungsstelle darstellt.

Für das Standardsystem mit *B. subtilis*-DNA = 55.5 % AT und *M. luteus*-DNA = 27.5 % AT gilt:

$$B_{M.l.} = f_{AT} = 0.275$$

$$B_{B.s.} = f_{AT} = 0.555$$

was einen Spezifitätsparameter $\alpha = \frac{0.275}{0.555} = 0.50$ ergeben würde ²⁸⁾.

Experimentelle α -Werte kleiner als 0.5 zeigen an, daß die Bindung entweder mehrere gleiche Basenpaare erfordert, und/oder an beiden Seiten eines Basenpaares erfolgen kann ²⁸⁾.

Für zwei benachbarte AT-Paare als optimale Bindungsstelle gilt ²⁸⁾:

$$\frac{f_{AT}^2 (\text{DNA I})}{f_{AT}^2 (\text{DNA II})} = 0.25$$

Für drei AT-Paare folgt $\alpha = 0.12$, für vier AT-Paare $\alpha = 0.06$, für n AT-Paare $\alpha = 0.5^n$.

Im Verteilungssystem *M.luteus*-DNA und *C.acidi-urici*-DNA mit $f_{AT} = 0,275$ bzw. $f_{AT} = 0,655$ ergibt sich für ein AT-Paar $\alpha = 0.42$, für zwei AT-Paare $\alpha = 0.18$, für drei AT-Paare $\alpha = 0.07$ und für n AT-Paare $\alpha = 0.42^n$.

Der Achsenabschnitt mit der Ordinaten ergibt also über α die Anzahl von AT-Paaren, die die optimalen Bindungsstellen darstellen, der Kehrwert des Abszissenabschnittes gibt die Anzahl der Basenpaare an, die ein Ligand beansprucht.

Die Steigung im linearen Teil des Scatchard-Diagramms ist ein Zeichen der Bindungsaffinität, die Bindungskonstante.

Daß in den meisten Fällen die Scatchard-Auftragung keine Gerade ergibt, sondern eine mehr oder weniger stark gebogene Kurve, kann so interpretiert werden, daß die Liganden sich gegenseitig beeinträchtigen⁶⁸⁾. Möglicherweise liegen auch mehrere Klassen von Bindungsstellen auf der DNA vor, zu denen die Liganden unterschiedliche Affinität und Spezifität haben.

3. Arbeitsvorschriften zur Gewinnung von Trypanosomen-DNA

3.1. Aufzucht von Trypanosomen

Da bisher nur ein einziger erfolgreicher Versuch, Trypanosomen der brucei-Gruppe in vitro zu kultivieren, beschrieben ist ⁹⁵⁾, und bei den meisten anderen Versuchen sich die infektiöse Blutstromform in die morphologisch veränderte Form des Mückendarms, die Crithidiaform, umgewandelt hat, wurden Trypanosomen aus infizierten Ratten gewonnen.

Die Ratten werden je nach Gewicht mit 0,2-0,4 ml hoch positivem trypanosomenhaltigem Blut von Mäusen durch intraperitoneale Injektion infiziert. Nach 3-5 Tagen haben sich die Trypanosomen so stark vermehrt, daß in mikroskopischen Blutaussstrichen mehr als 200 Trypanosomen pro Gesichtsfeld zu sehen sind.

Die hochinfizierten Ratten werden mit Ether narkotisiert, und durch Eröffnen von Bauch und Thoraxraum wird das Herz freigelegt. Durch Herzpunktion wird das Blut mittels einer heparinisierten Spritze entnommen. Auf diese Weise gewinnt man 8-14 ml Blut aus etwa 300 g schweren Ratten.

Herrn G. H a r b a u m - N e u h a u s danke ich recht herzlich für die kameradschaftliche Unterstützung bei der Isolation von T. rhodesiense, Herrn Dr. Dr. Dr. E. F i n k und Herrn Prof. Dr. J. B a f o r t für freundliche Unterstützung und die vielseitigen Ratschläge.

3.2. Säulenchromatographische Trennung der Trypanosomen vom Blut des Wirts ^{96,97,98)}

Materialien:

Diethylaminoethylcellulose DE 52-Whatmann vorgequollen
PBS-Puffer, pH = 8,0: 3 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
57 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
43,6 mM NaCl
 H_2O ad 1000,0
PBSGH-Puffer, pH = 8,0: 50 mM Glucose x H_2O
5000 USP-Einheiten Heparin
PBS-Puffer ad 1000,0

Säulen:

Glassäulen 20 x 3,7 cm mit Kühlmantel
Bettvolumen ca. 120-130 ml bei einer Füllhöhe von 14,5 cm
Kapazität pro Säulenfüllung: 50 ml Blut-Puffer-Gemisch

Arbeitsgang:

Das nach ^{96,97)} behandelte PBSGH-äquilibrierte Gel wird in die Säule gefüllt und nach dem Sedimentieren und Nachwaschen wird das mit PBSGH versetzte Blut aufgegeben und mit Puffer unter Methanol-Kühlung bei 4° C eluiert, bis sich keine Trypanosomen mehr im Mikroskop nachweisen lassen. Das Eluat wird unter Eiskühlung in Zentrifugenbechern aufgefangen und die Trypanosomen durch Zentrifugieren (20', 4° C, 10000 UpM) gesammelt.

Variationen in der säulenchromatographischen Trennung: Bei größeren Ansätzen, mit Blutmengen von ca. 300 ml, wird nach folgenden Varianten verfahren:

1. Die Säulen werden nur zur Hälfte mit Gel gefüllt und das Blut mit gleichem Volumen Gel 20 Minuten verrührt. Anschließend erfolgt die Aufgabe auf die halbgefüllte Säule.
2. Das gesamte Blut wird nach der Entnahme bei 400-800 UpM

20 Minuten zentrifugiert. Die Blutkörperchen sammeln sich am Becherboden, während die Trypanosomen ein schwebendes Pellet ausbilden, das abpipettiert werden kann. Nach guter homogener Vermischung mit PBSGH-Puffer werden sie auf eine DE 52-Säule aufgetragen und chromatographiert.

Die Elution mit PBSGH liefert rein weiße, im mikroskopischen Bild blutkörperchenfreie, sich sehr stark bewegende, infektiöse Trypanosomen. Diese werden durch Zentrifugation gesammelt, mehrfach mit Puffer (je nach Verwendungszweck) gewaschen und bei -60° C eingefroren. Ausbeute pro Ratte: ca. 500 mg T.rhodesiense Naßgewicht nach 20 Minuten Zentrifugieren bei 14000 UpM.

3.3. Sicherheitsvorkehrungen zur Verhinderung von Selbstinfektionen

Da T.rhodesiense zu den menschenpathogenen Trypanosomenarten gehört, wurden zur Vermeidung von Selbstinfektionen folgende Schutzmaßnahmen getroffen:

1. Die Versuche erfolgten in verschlossenen Räumen, deren Zugang unbefugten Personen verwehrt war.
2. Alle in den Laboratorien tätigen Personen trugen Schutzkittel, Schutzbrillen, Gummihandschuhe und nach Möglichkeit einen Mundschutz.
3. Beim Verlassen der Arbeitsräume wurden in einem Vorraum die Schutzkleidung abgelegt und die Hände mit einem Desinfektionsmittel gründlich gereinigt.
4. Die Labortische wurden nach dem Ende der Versuche zuerst mit Wasser, dann mit einem Desinfektionsmittel gereinigt.
5. Infektiöses Material wurde gut verpackt nach 2-3 Tagen zur Verbrennungsanlage gebracht und verbrannt.

3.4. Isolation von Trypanosomen-DNA ^{68,99)}

Die tiefgefrorenen Trypanosomen werden in folgende Lösung eingetragen und bei 50° C 2-3 Std. mit 200 UpM inkubiert:

0.05 m Tris pH = 8.0, 0.5 m EDTA, 0.1 % Sarkosyl (N-Lauroyl-sarkosin: Serva), 0.1mg/ml Proteinase K (Merck). Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird die Suspension im Eisbad dreimal mit dem gleichen Volumen Phenol 20 Minuten lang geschüttelt. Das frisch im Vakuum destillierte Phenol wird vorher mit dem gleichen Volumen 0.05 m Trispuffer pH = 8.0 äquilibriert und so auf pH = 8.0 eingestellt. Anschließend versetzt man es mit 0.1 % 8-Hydroxychinolin, wodurch es sich gelb färbt.

Nach jeder Phenolisierung wird die Mischung 20 Minuten bei 0-4° C und 9000 UpM zentrifugiert, die farblose, DNA-haltige Phase abgehoben und die gelb gefärbte Phenolphase verworfen. Zuletzt wird einmal mit dem gleichen Volumen iso-Amylalkohol + Chloroform 1 + 24 extrahiert, die DNA-Phase abgehoben und erschöpfend gegen TES-Puffer pH = 8.0 dialysiert, bis die Extinktion des Puffers bei 270 nm < 0.05 ist.

Eine Probe der T.rhodesiense-DNA wird in 0.6 % Agarosegel in einer Disc-Elektrophorese-Apparatur aufgetrennt⁶⁸⁾. Dazu wird die DNA-Lösung erschöpfend gegen den "Elektrophorese-Puffer" (36mM Tris, 30 mM NaH₂PO₄, 10 mM EDTA pH = 7.1) dialysiert und die Proben in 30 Minuten bei 70 V aufgetrennt. Die Entwicklung erfolgt im Elektrophorese-Puffer, dem 0,5 µg Ethidiumbromid/ml zur Anfärbung der DNA zugesetzt werden.

Als Vergleich dient Phage T 7 DNA mit einem Molekulargewicht von 25×10^6 d.

Die Hauptbande der T.rhodesiense-DNA hat ein etwas höhe-

res Molekulargewicht als die Vergleichs-DNA. Ob neben der Hauptbande noch andere DNA-Bestandteile zugegen sind, läßt sich nicht feststellen, möglicherweise sind sie mit der Front gewandert.

Versuche in 0.8 % Agarose, bzw. 1.5 % Agarose slab-Gel mit λ -Eco RI-Hydrolysat bei 35 bzw. 40 V und 9 Std. Laufzeit zeigten zwei Bestandteile an (S. Abbildungen Nr. 9 und 10):

1. sehr hochmolekularen Anteil am Start
2. Hauptfraktion ca. 15 Mill. d

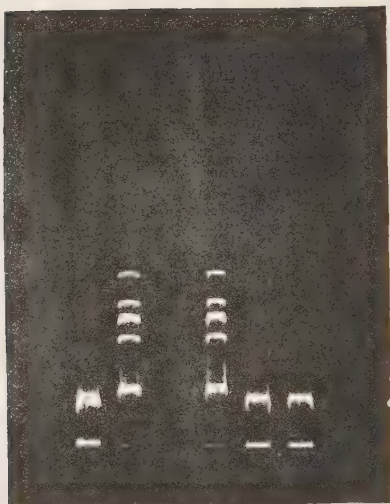
3.5. Trennung der Trypanosomen-DNA in Kinetoplasten und chromosomale DNA

3.5.1. CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradient

Die Nucleinsäure-Lösung wird mit CsCl auf einen Brechungsindex von 1.3901 entsprechend einer Dichte von 1.5992 g/cm^3 eingestellt ¹⁰⁰⁾ und mit Ethidiumbromid-Lösung versetzt, in Zentrifugenröhrchen gefüllt, mit Paraffin überschichtet und 40 Std., 35000 UpM, 20° C zentrifugiert.

Die Abbildungen Nr.11 und 12 zeigen die scharfe Auftrennung in zwei Komponenten, bei der oberen handelt es sich um die Hauptmenge der Trypanosomen-DNA, und darunter ist ein schmaler Ring der kovalent geschlossenen zirkulären DNA zu sehen, bei der es sich um den Hauptteil der K-DNA handeln dürfte. Beide Fraktionen werden getrennt gesammelt, erneut mit CsCl bzw. H₂O auf eine Dichte von 1.599 eingestellt und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Aus den sauber getrennten Fraktionen wird Ethidium mit Butanol-(2) extrahiert ⁶⁸⁾. Die DNA-Phasen werden mit



1 2 3 4 5

Abbildung Nr.9

Gelelektrophoretische Trennung von T.rhodesiense-DNA

1: 4 γ DNA

4: 3 γ DNA

5: 2 γ DNA

2, 3: λ -Eco RI-Hydrolysat als Vergleich

0.8 % Agarose-slab-Gel

35 V, 9 Std.

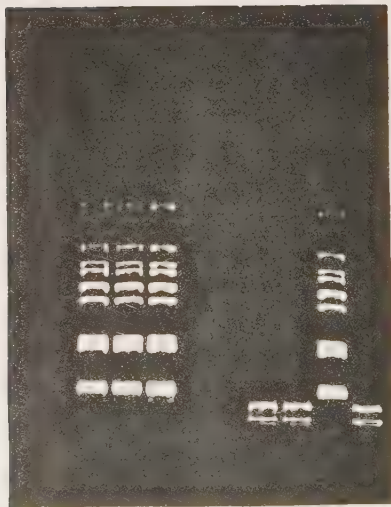


Abbildung Nr.10

Gelelektrophoretische Trennung von T.rhodesiense-DNA,

50 γ DNA, λ -Eco RI-Hydrolysat als Vergleich

1,5 % Agarose-Gel

40 V, 9 Std.

Photographiert unter UV-Beleuchtung in einem Original Hanau UV-Fluotestgerät mit einer Polaroid 195 land camera mit rot-orange Filter

Chloroform geschüttelt, zentrifugiert und die wässrigen Phasen erschöpfend gegen BPE dialysiert.

Ausbeute: K-DNA 0.15 mg, chromosomale DNA 2.46 mg aus 9 g T.rhodesiense-Zellen.

Die Abbildungen Nr.13 bis 15 zeigen die Fraktionen in der analytischen Ultrazentrifuge.

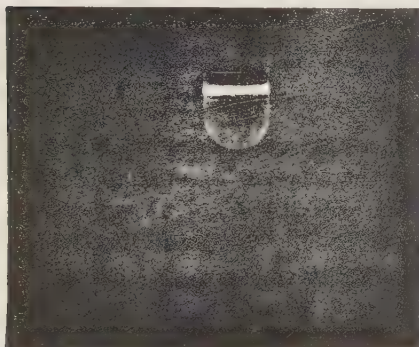


Abbildung Nr.11

CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradienten-Auftrennung von T.rhod.-DNA in der präparativen Ultrazentrifuge

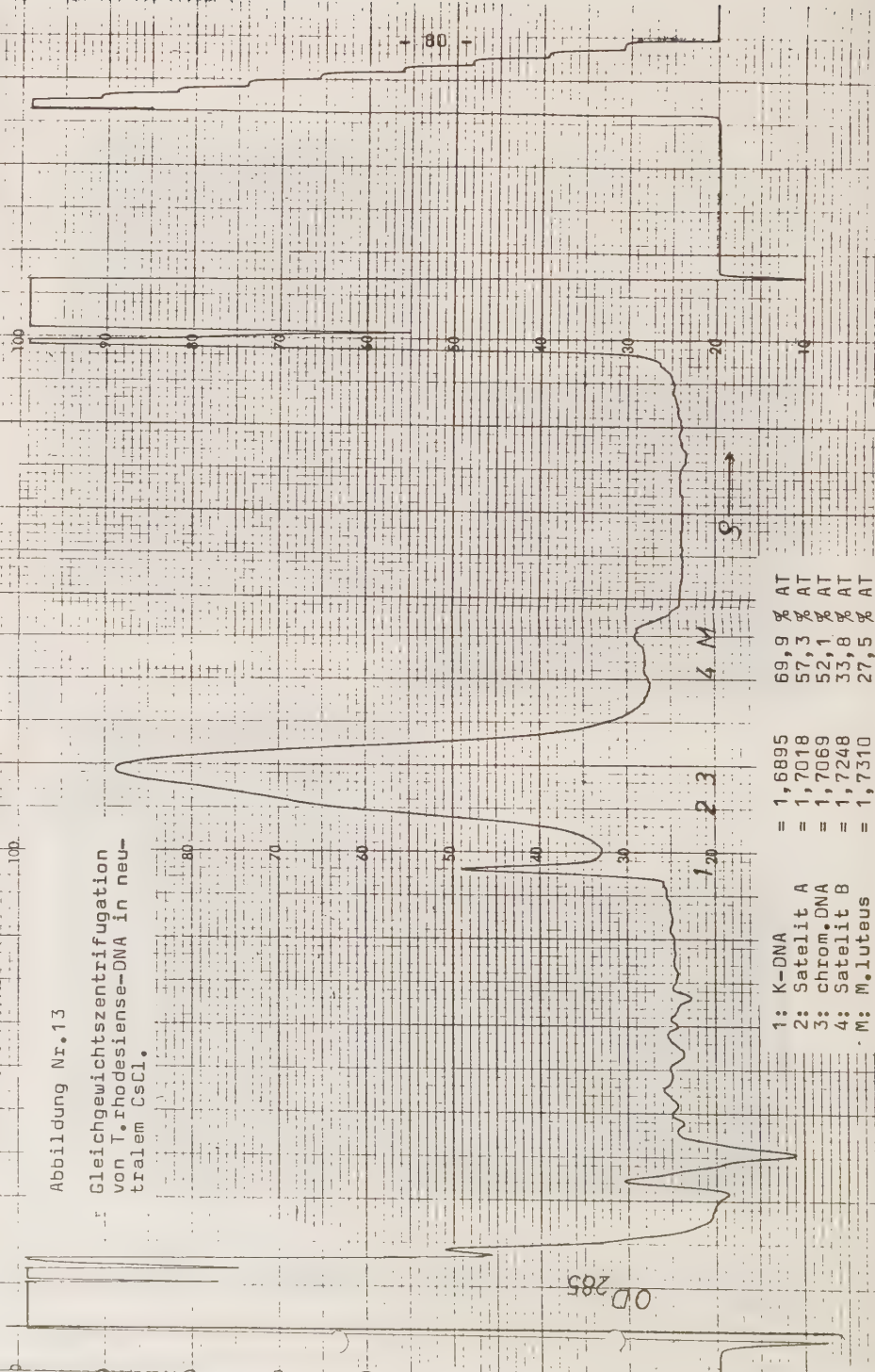


Abbildung Nr.12

Anreicherung von K-DNA (Mitte) aus der Auftrennung aus Abb. Nr.11 und reine chromosomale DNA

Abbildung Nr. 13

Gleichgewichtszentrifugation
von T. rhodensis-DNA in neu-
tralem CsCl.



1: K-DNA
2: Satellit A
3: chrom.-DNA
4: Satellit B
M: M.luteus

= 1,6895
= 1,7018
= 1,7069
= 1,7248
= 1,7310

69,9 % AT
57,3 % AT
52,1 % AT
33,8 % AT
27,5 % AT

Gleichgewichtszentrifugation
von T. rhodesiense-DNA aus der
Trennung von Abb. Nr. 11

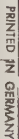
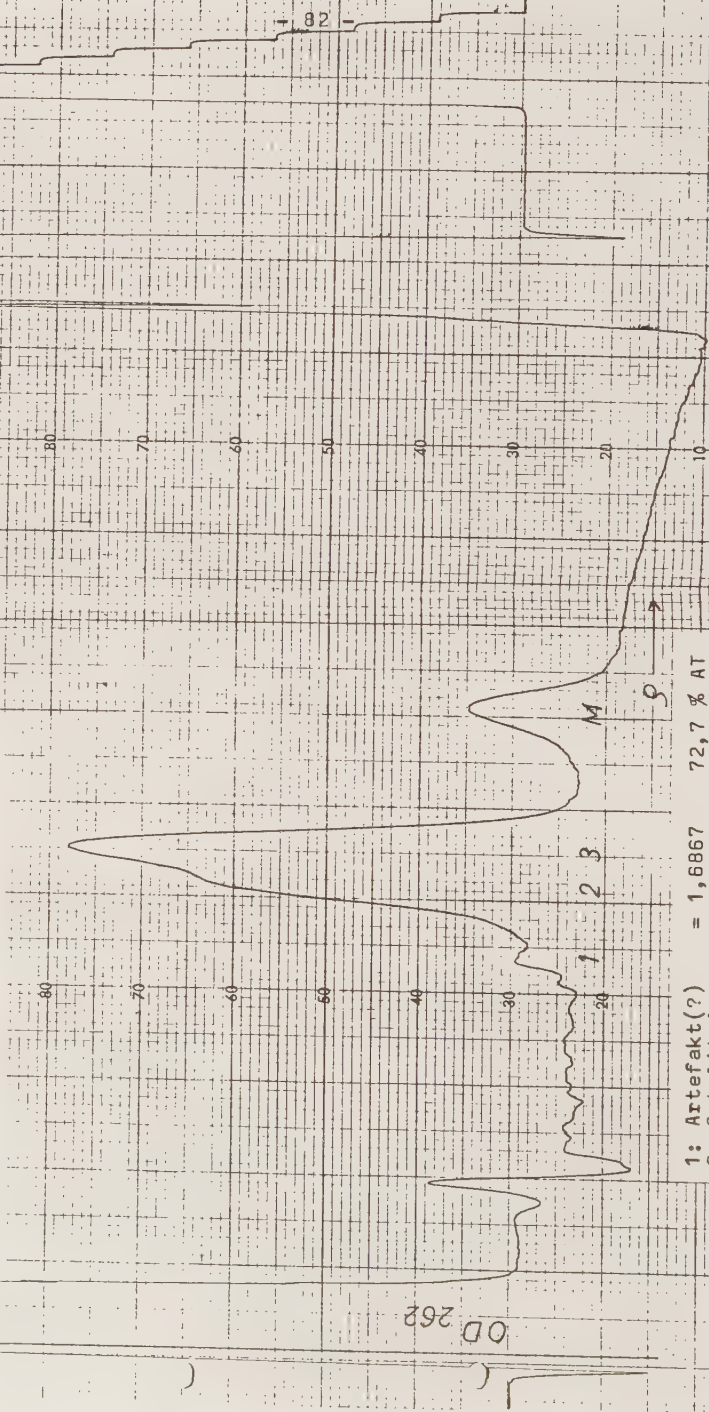


Abbildung Nr.15

Gleichgewichtszentrifugation
von I. Rhodense-DNA aus der
Trennung von Abb.Nr.11



3.5.2. Affinitätschromatographie

H. B ü n e m a n n und W. M ü l l e r ¹⁰¹⁾ entwickelten eine affinitätschromatographische Methode, die sich zur Trennung von DNA-Arten verschiedenster Herkunft als erfolgreich erwies.

Das Chromatographiematerial besteht aus quervernetztem Bisacrylamid, an das basenpaarspezifische Farbstoffe kovalent durch Brücken von Polyacrylamidketten verschiedener Länge gebunden werden.

Das Material mit festgebundenem AT-spezifischem Malachitgrün eignet sich zur basenpaarspezifischen Fraktionierung von DNA-Lösungen, das GC-spezifische Phenylneutralrot eignet sich zur Abtrennung von "supercoiled" DNA aus DNA-Mischungen ¹⁰²⁾.

Arbeitsweise:

Eine Chromatographiesäule von 1,5 x 25 cm, ausgerüstet mit zwei Adaptoren, wird zu etwa 2/3 mit dem polymer-gebundenen Phenylneutralrot gepackt und mit BPE-Puffer pH = 5,8 solange äquilibriert, bis die Leitfähigkeit des Eluats gleich der von reinem BPE-Puffer ist. Auf die Säule werden 3 ml DNA aus *T. rhodesiense* mit einem Gehalt von 10 O.D. mit einer Flußgeschwindigkeit von 12 ml/Std. aufgegeben und mit einem linearen Natriumperchlorat-Gradienten 0-2 Mol/l in BPE eluiert.

Das Eluat wird mittels einer Durchflußzelle kontinuierlich bei 258 nm vermessen, die Extinktion mit einem Schreiber registriert und in 1 ml Fraktionen gesammelt.

Die in lineare und zirkuläre DNA-Moleküle getrennten Fraktionen werden gesammelt, eingeeengt und dialysiert.

Die Fraktion, die zirkuläre DNA enthält, wird in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht und zeigt folgendes Aussehen: S. Abbildung Nr.16.

Die Fraktion mit linearer DNA wird auf eine Acrylmalachitgrünsäule aufgetragen und unter gleichen Bedingungen, wie bei der Phenylneutralrotsäule beschrieben, chromatographiert.

Die Fraktionen dieser Trennung werden ebenfalls gesammelt, konzentriert, gegen BPE dialysiert, der Gehalt im Extinktionsmaximum bestimmt und in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. S. Abbildungen Nr.17 bis 20.

Abbildung Nr. 16

Gleichgewichtszentrifugation
von T. rhodensis-DNA, zirkuläre
Fraktionen der Phenyl-
neutralrot-Trennung

OD₂₆₂

- 1: K-DNA
2: Satellit A
3: chrom. DNA
4: Satellit B
M: M. luteus

= 1,6886
= 1,6981
= 1,7074
= 1,7224
= 1,7310

70,8 % AT
61,1 % AT
51,6 % AT
36,3 % AT
27,5 % AT

Abbildung Nr. 17

Gleichgewichtszentrifugation
von T. rhodensis-DNA, Frak-
tionen 32-42 der Acrylamid-
gelschichtgrün-Trennung

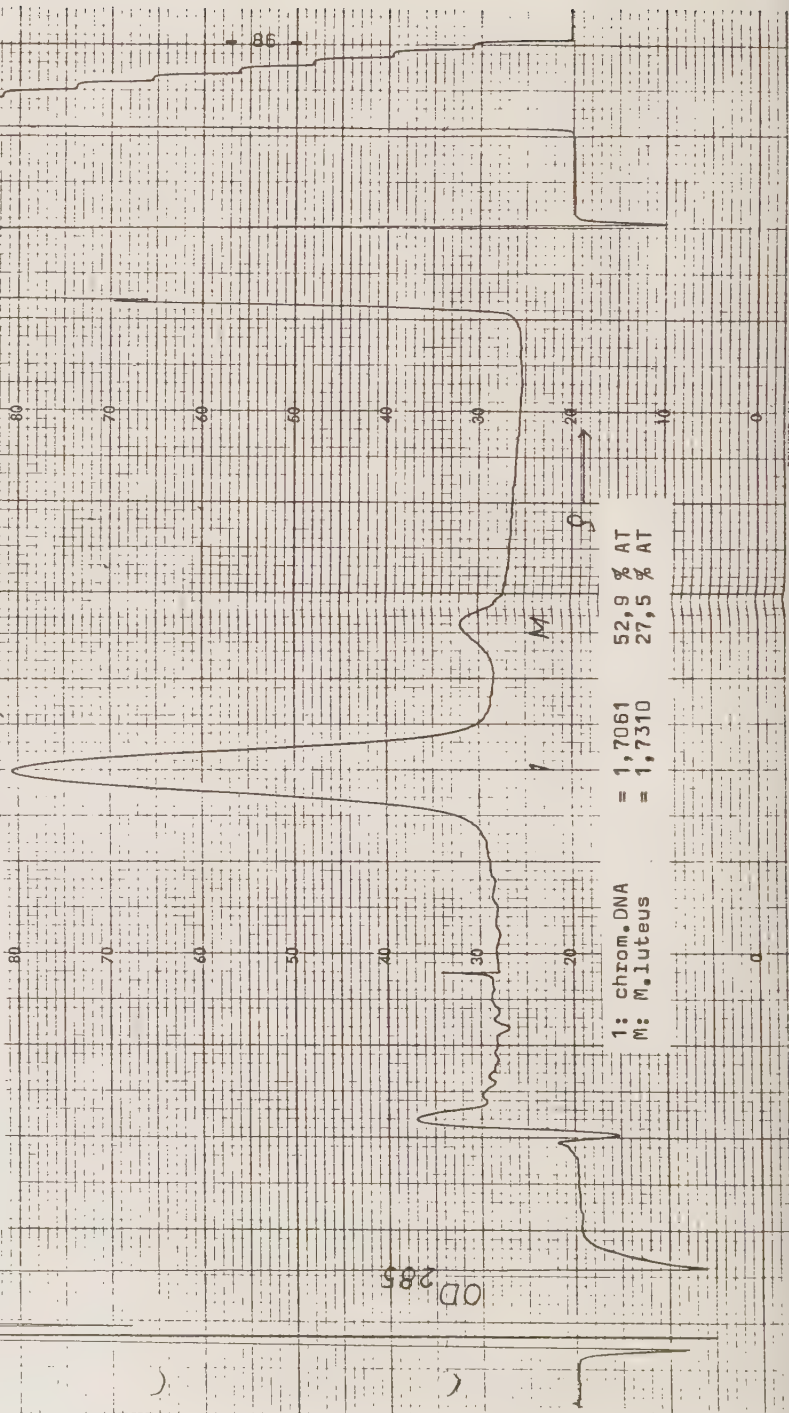


Abbildung Nr. 18

Gleichgewichtszentrifugation
von T. rhodensis-DNA, Fraktionen 43-52 der Acrylmale-
chitgün-Trennung

OD₂₈₅

1: Satellit A
2: Chrom. DNA
M: M. luteus

= 1,7005
= 1,7044
= 1,7310

58,7 % AT
54,7 % AT
27,5 % AT

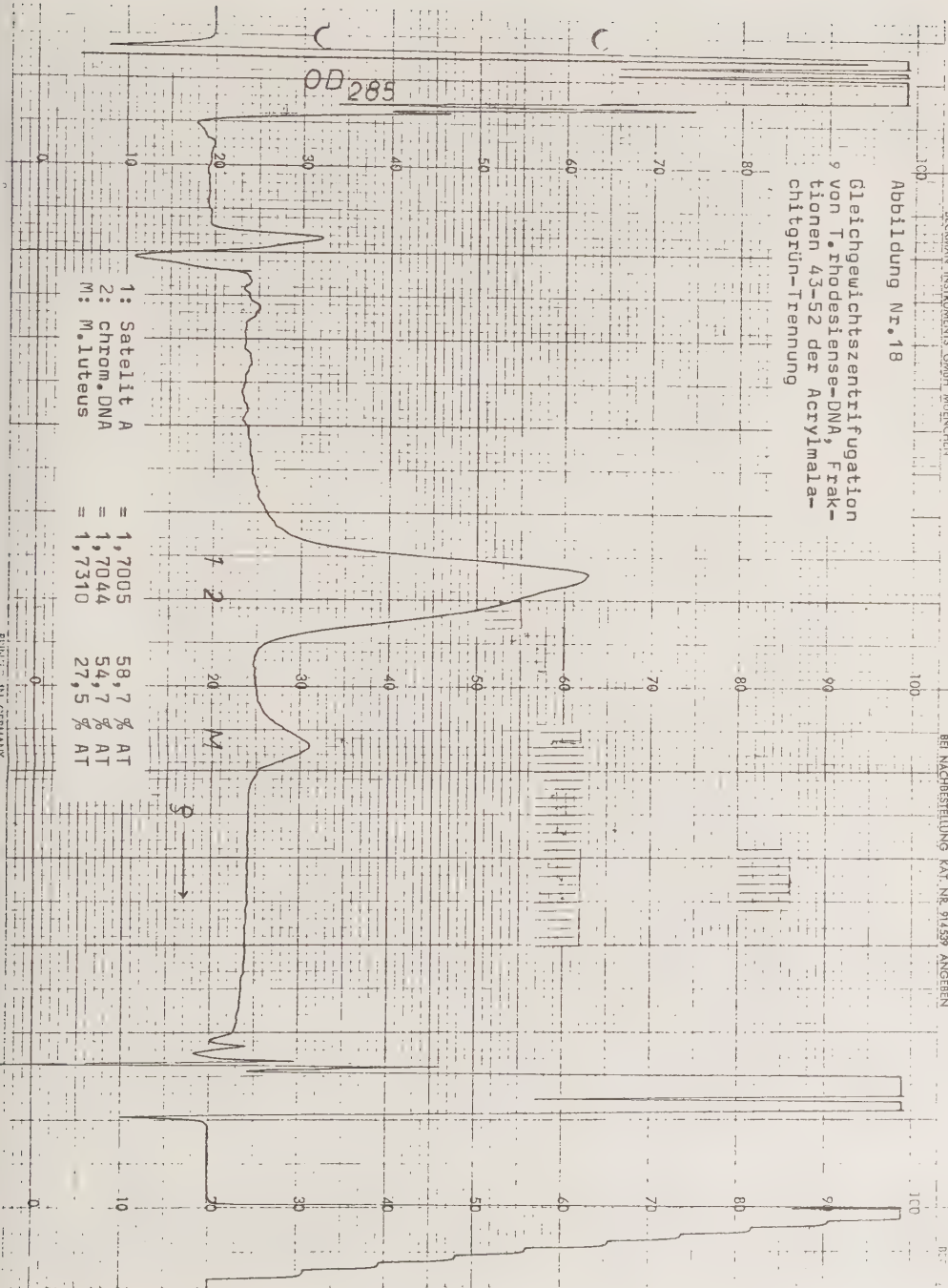


Abbildung Nr. 19

Gleichgewichtszentrifugation
von T. rhodensis-DNA, Frak-
tionen 53-71 der Acrylmala-
chitgrün-Trennung

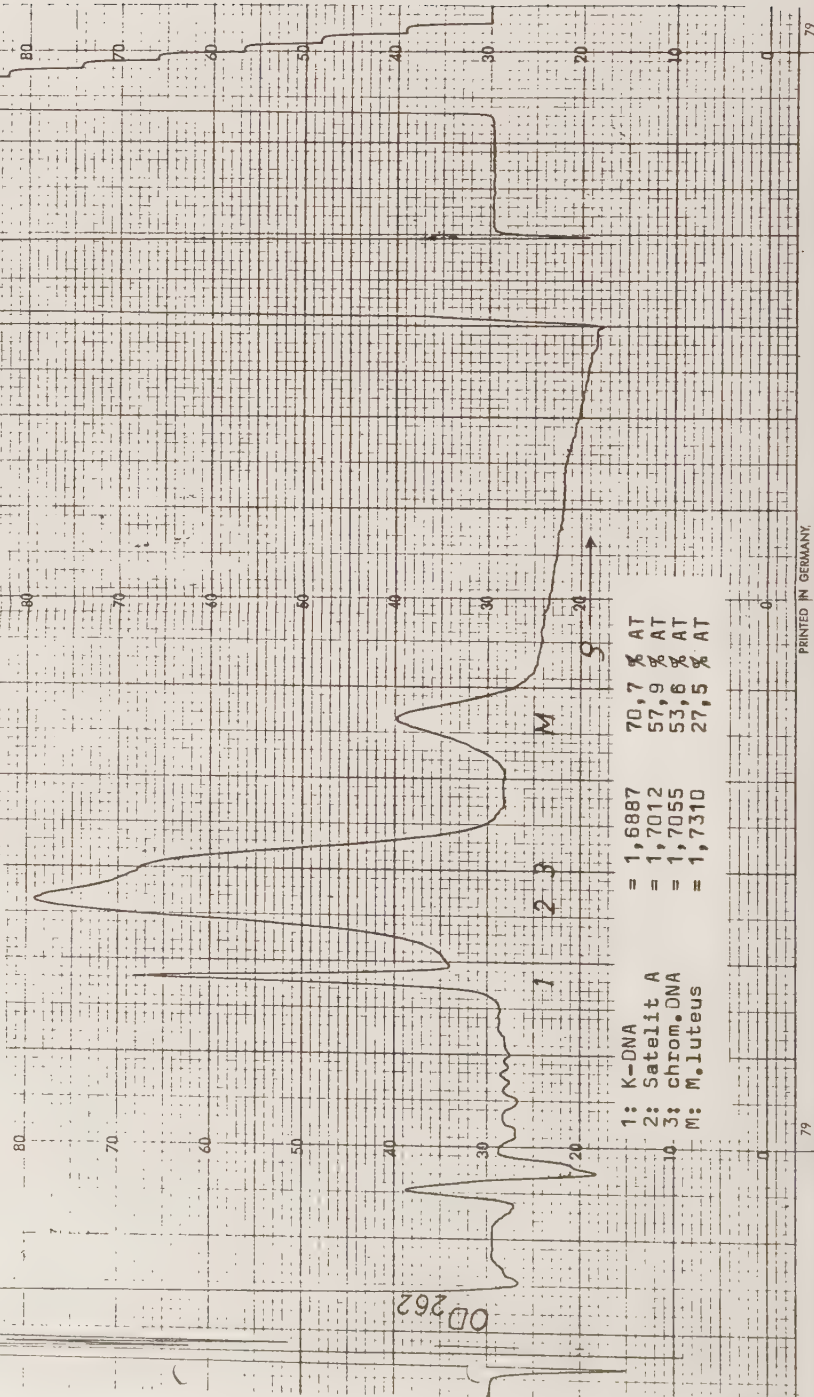
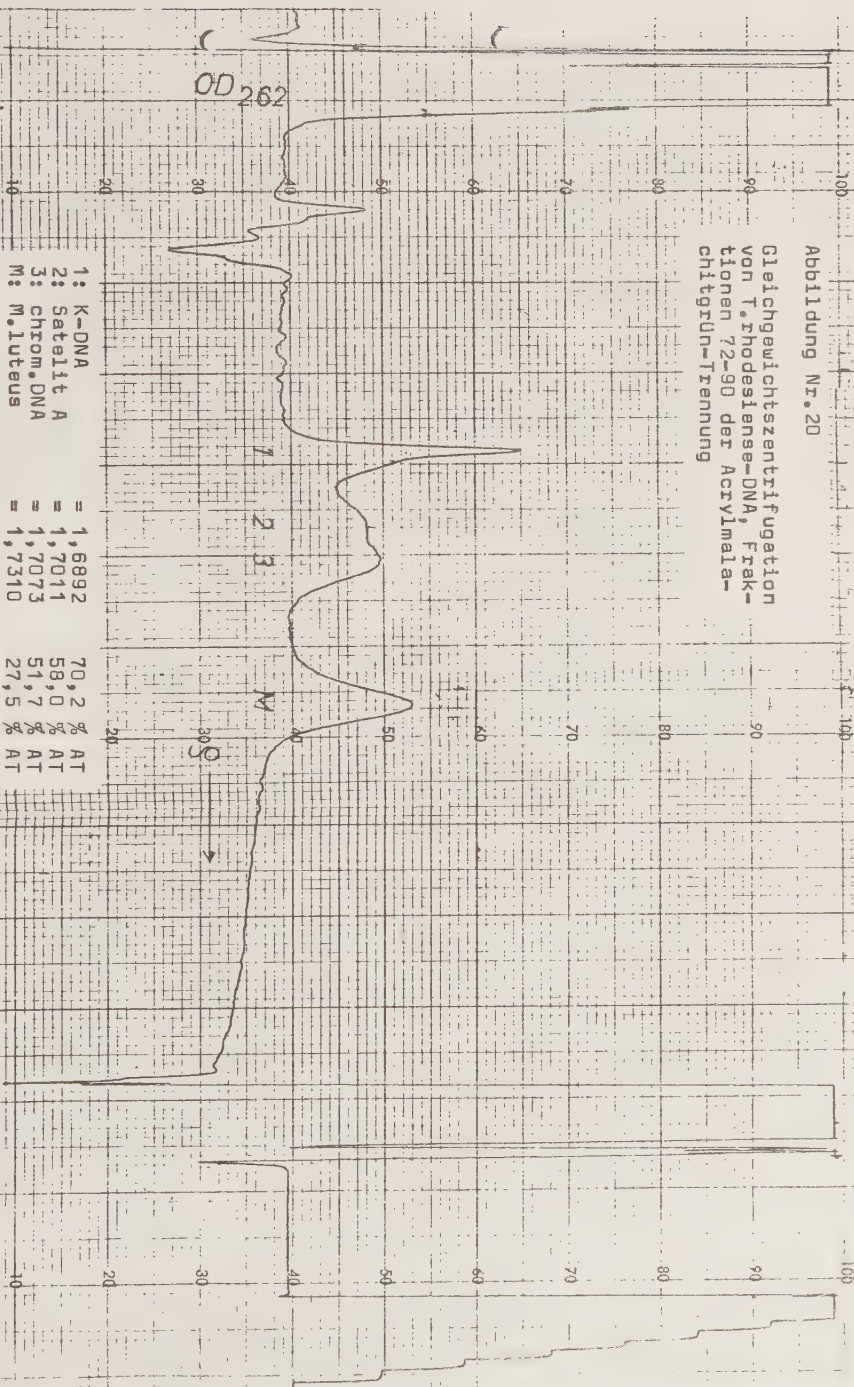


Abbildung Nr. 20

Gleichgewichtszentrifugation
von T. rhodensis-DNA, Frak-
tionen 72-90 der Acrylamida-
citgrün-Trennung



Anhang: Berechnungsbeispiele

I. Konzentration und alkalische Hyperchromie von DNA-Lösungen

Die Konzentration der DNA-Lösungen zu Gleichgewichtsdiagrammen soll etwa 0.1 mg/ml betragen.

Es werden jeweils 0.5 ml *M.luteus*- und *B.subtilis*-DNA-Lösung mit 2.0 ml BPES-Puffer pH = 7.0 versetzt und in Quarzküvetten mit Schichtdicken von 1 cm gegen BPES als Leerwert im Spektralphotometer vermessen. Aus der ermittelten Extinktion bei 260 nm und den molaren Extinktionskoeffizienten von $1,385 \times 10^4$ für ein *M.luteus*-DNA-Basenpaar, bzw. von $1,282 \times 10^4$ für *B.subtilis*, läßt sich der Gehalt der DNA-Lösungen berechnen.

1. *M.luteus*-DNA

$$E = 0,431 \cdot \frac{2,5 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} = 2,155 \text{ O.D./ml}$$

$$c = \frac{2,155}{1,385 \cdot 10^4} = 1,556 \cdot 10^{-4} \text{ mMol Basenpaare/ml}$$

2. *B.subtilis*-DNA

$$E = 0,3925 \cdot \frac{2,5 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} = 1,963 \text{ O.D./ml}$$

$$c = \frac{1,963}{1,282 \cdot 10^4} = 1,530 \cdot 10^{-4} \text{ mMol Basenpaare/ml}$$

Durch Zusatz von je 0.2 ml NaOH 5 m zu obigen Meßansätzen läßt sich die alkalische Hyperchromie bestimmen.

1. *M.luteus*

$$E_{\text{alkal.}} = 0,507 \cdot \frac{2,7 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} = 2,738 \text{ O.D./ml}$$

$$\frac{2,155}{100 \%} = \frac{2,738}{x} ; \quad x = 127 \% ; \text{ alkalische Hyperchromie} \\ = 27 \%$$

2. B.subtilis

$$E_{\text{alkal.}} = 0,469 \cdot \frac{2,7 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} = 2,532 \text{ O.D./ml}$$

$$\frac{1,963}{100 \%} = \frac{2,738}{x} ; \quad x = 129 \% ; \quad \text{alkalische Hyperchromie} = 29 \%$$

II. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ am Beispiel von Verbindung Nr.39

0.2 ml Stammlösung des Liganden in BPES ($c = 1.01 \times 10^{-4} \text{ M}$) werden mit 1.0 ml BPES versetzt, die Extinktion im Maximum bei 337 nm bestimmt und daraus die Extinktion der Stammlösung berechnet:

$$E = 0,546 \cdot \frac{1,2 \text{ ml}}{0,2 \text{ ml}} = 3,276 \text{ O.D./ml Stammlösung.}$$

Daraus ergibt sich für :

$$\epsilon = \frac{3,276}{1,01 \cdot 10^{-4} \cdot 1} = 32400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Nach Zusatz von 0.1 ml Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS), 25 %ig, ergibt die Bestimmung im langwellig verschobenen Maximum bei 353 nm eine Extinktion von 0.50 O.D. bzw. von 3.25 O.D. pro ml Stammlösung und einen molaren Extinktionskoeffizienten von 32000. Dieser dient zur Berechnung in den Gleichgewichtsdialysebestimmungen.

III. Gleichgewichtsdialyse

$$c_{\text{ML-DNA}} = 1,556 \times 10^{-4} \text{ mMol Basenpaare/ml}$$

$$c_{\text{BS-DNA}} = 1,530 \times 10^{-4} \text{ mMol Basenpaare/ml}$$

$$\epsilon_{\text{Lig.Nr.39}} = 32000 \text{ bei } 353 \text{ nm in SDS-haltiger Lösung.}$$

Die Beladung der DNA beginnt mit niedrigen Ligandenkonzentrationen. In die äußeren Kammern werden jeweils 5 ml B.subtilis-, bzw. M.luteus-DNA einpipettiert, in die mittlere Kammer 4,9 ml BPES-Puffer und 0.1 ml Liganden-

stammlösung. Nach 48stündiger Gleichgewichtseinstellung erfolgt die erste Probenentnahme.

1. Aus der mittleren Kammer werden 3.0 ml entnommen, in einer 4 cm - Halbmikro-Quarzküvette mit 0.3 ml SDS-Lösung 25 %ig versetzt und nach dem vorsichtigen Vermischen gegen BPES mit 10 % SDS im Spektralphotometer vermessen. Im Maximum bei 353 nm ergibt sich $E = 0.017$ O.D., woraus $E_{\text{korrr}} = 0.017 \cdot \frac{3.3}{3.0} : 4 = 0.00467$ O.D./ml und mit $\epsilon = 32000$ die Konzentration zu $c = 1.46 \times 10^{-7}$ m ermittelt werden.

Dies ist die Konzentration an freiem Ligand, die im Gleichgewichtszustand nicht an die DNA gebunden wurde. Sie wird mit m bezeichnet.

2. Aus der *M.luteus*-DNA-Kammer wird analog 1. eine 3.0 ml Probe entnommen und gegen den freien Ligandenanteil m gemessen, und so die an diese DNA gebundene Ligandenkonzentration bestimmt:

$E_{353 \text{ nm}} = 0.064 \cdot \frac{3.3}{3.0} : 4 = 0.0176 : \epsilon = 5.50 \times 10^{-7}$ m.
Durch Division der DNA-gebundenen Ligandenkonzentration durch die DNA-Konzentration erhält man das Verhältnis r bei der obigen freien Ligandenkonzentration:

$$r_{\text{ML}} = \frac{c_{\text{Lig. geb.}}}{c_{\text{DNA}}} = \frac{5.50 \cdot 10^{-7}}{1.556 \cdot 10^{-4}} = 0.0035,$$

welches durch m dividiert wird:

$$\frac{r_{\text{ML}}}{m} = \frac{0.0035}{1.46 \cdot 10^{-7}} = 2.42 \cdot 10^4$$

3. Mit der *B.subtilis*-DNA-Kammer verfährt man ebenso und erhält:

$E_{353 \text{ nm}} = 0.16 \cdot \frac{3.3}{3.0} : 4 = 0.044 : \epsilon = 1.375 \times 10^{-6}$ m

$$r_{\text{BS}} = \frac{1.375 \cdot 10^{-6}}{1.530 \cdot 10^{-4}} = 0.009; \quad \frac{r_{\text{BS}}}{m} = \frac{0.009}{1.46 \cdot 10^{-7}} = 6.1 \cdot 10^4$$

4. Den Spezifitätsparameter α' der Verteilung erhält man aus dem Quotienten

$$\alpha' = \frac{r_{ML}}{r_{BS}} = \frac{0.0035}{0.009} = 0.390.$$

In den äußeren DNA-Kammern werden die DNA-Lösungen ergänzt, die mittlere Ligandenkammer wird völlig entleert, mit Puffer gewaschen und mit 0.2 ml Stammlösung und 4.8 ml BPES-Puffer aufgefüllt. Nach 48stündiger Gleichgewichtseinstellung werden wieder Proben entnommen und man erhält auf diese Weise eine Reihe von korrespondierenden Meßwerten m , r_{ML} , r_{ML}/m , r_{BS} , r_{BS}/m und α' , die in nachfolgender Wertetabelle aufgezeichnet sind und mit denen Abbildung Nr.3, S.30, erstellt wurde.

Meß.Nr.	m $m \cdot 10^{-7}$	r_{ML}	r_{ML}/m $m^{-1} \cdot 10^4$	r_{BS}	r_{BS}/m $m^{-1} \cdot 10^4$	α'
1 ^{x)}	1,46	0,0035	2,42	0,009	6,1	0,390
2 ^{x)}	1,55	0,0089	5,74	0,022	14,07	0,408
3	0,77	0,0082	10,60	0,030	38,8	0,273
4	1,72	0,011	6,42	0,049	28,8	0,223
5	4,04	0,024	6,01	0,077	19,0	0,316
6	5,5	0,026	4,63	0,066	12,0	0,385
7	13,2	0,052	3,90	0,111	8,36	0,467
8	25,4	0,081	3,18	0,1365	5,37	0,593
9	44,3	0,119	2,70	0,170	3,84	0,702
10	54,0	0,144	2,67	0,186	3,45	0,776

x) Ab Meßwert Nr.3 ergibt sich Scatchard-gemäßer Verlauf der graphischen Darstellung, Nr.1 und 2 waren durch Staubteilchen im m -Teil zu hoch.

Die graphische Darstellung der Gleichung $\alpha' = f(r_{BS})$ liefert als Ordinatenabschnitt den extrapolierten Wert für α . Aus der Darstellung $r_{DNA}/m = f(r_{DNA})$ erhält man mit den extrapolierten Ordinatenabschnitten die Affinitätswerte σ_{ML} und σ_{BS} , sowie aus der Steigung des linearen Anteils der Isotherme für *B. subtilis*-DNA die Bindungskonstante K_{app} . Der extrapolierte Schnittpunkt des linearen Isothermenanteils mit der Abszisse ergibt die apparente Anzahl von Bindungspunkten B_{app} , deren Kehrwert n die Anzahl Basenpaare anzeigt, die ein Ligand als Bindungsstelle beansprucht.

Für das beschriebene Beispiel Nr. 39 ergibt sich:

$$\sigma_{ML} = 1.0 \times 10^5 ; \sigma_{BS} = 5.6 \times 10^5$$

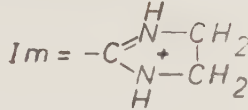
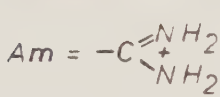
$$\alpha_{extrapol.} = 0.17$$

$$\alpha = \frac{\sigma_{ML}}{\sigma_{BS}} = 0.178$$

$$K_{app} = 5.4 \times 10^6 ; B_{app} = 0.11 ; n = 9$$

Tabelle 2

Bindungsparameter der untersuchten Substanzen an bakterielle DNAs



- $-K_{app}$ = apparente Bindungskonstante
 n_{app} = apparente Anzahl von Bindungspunkten auf der DNA, die von einem Liganden beansprucht werden
 n_{AT} = Anzahl von AT-Basenpaaren als optimale Bindungsstelle auf der DNA
 λ_{max} = Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Liganden
 ϵ = molarer Extinktionskoeffizient, der zur Berechnung verwendet wurde
- in BPES-Puffer pH = 7,0
 - in Cacodylat-Kochsalzpuffer pH = 5,9
 - in SDS-haltiger Lösung
- α : Die Werte stammen aus der Verteilung zwischen *M. luteus* und *B. subtilis*-DNA
- Verteilungswerte zwischen *M. luteus* und *C. acidurici*, vgl. S. 71-72.

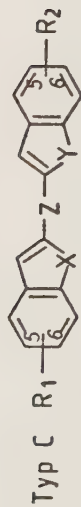


Nr	X	Y	R ₁	R ₂	Spezifitäts- parameter α	Affinitätsparameter $\sigma \cdot M^{-1} \cdot 10^4$			K_{opp} $M^{-1} \cdot 10^5$	n_{app}	n_{AT}	λ_{max} nm	ϵ $M^{-1}cm^{-1}$	Synth.-Ref. Code-Nr.
						Milut. B. subl.	% AT	C. ac.-ur.						
1	NH	CH	Am 6	Am 4'	0,02 ^d 0,05 0,06 0,07	6 5 5,5 6	27,5 55,5	65,5	~100 36 30-50 80	7-8 11 9-10 12	4 4 4 4	343 ^a 341 ^b 341 ^b 341 ^b	29000 ^a 33700 ^c 33700 ^b 31000 ^b	103 102/198 DAPI
2	NH	CH	Im 6	Im 4'	0,06 ^d 0,06	4 3		54 60	18 25	6 7	3-4 4	350 ^a	28100 ^a	104 192/188
3	S	CH	Im 6	Im 4'	0,60	4	6		4,7	7-8	1	330 ^a	~25000 ^a	105 261/5
4	O	CH	Im 5	Im 4'	0,33 0,15 ^d	1,5 1,4	4,5		3,1 6,7	7 7	2 2	328 ^a	~25000 ^a	105 261/45
5	SO ₂	CH	Am 5	Am 4'	0,18	1,5	12		13	11	2-3	257 ^b 344 ^b	8600 ^c	106 161/80
6	O	CH	NH ₂ 5	Am 4'	0,26 ^d	0,07		0,27	0,3	11	1-2	330 ^a	15600 ^a	107 260/136
7	NH	CH	Am 6	H 4'	0,16	0,4	3		5	17	2-3	321 ^a	25000 ^b	108 271/179

Typ B



Nr	Z	R_1	R_2	Spezifitäts- parameter α	Affinitätsparameter $\delta \cdot M^1 \times 10^4$				K_{app} $M^{-1} \cdot 5 \times 10^5$	n_{app}	n_{AT}	λ_{max} nm	ϵ $M^1 \text{ cm}^1$	Synth.-Ref. Code-Nr
					Mlut.	Bsubl. C.ac.-ur								
						% AT	65,5							
							25,5	55,5						
20	-N=N-NH-	Am	Am	0,07 ^d	1,6			31	33	10	3	377 ^a	35000 ^a	124 Berenil R
21	-N=N-NH-	Im	Am	0,06 ^d	1,1			20	15	7-8	3	371 ^a	35000 ^a	105 261/81
22	-N=N-NH-	Im	Im	0,06 ^d	1			17,5	12	7-8	3	375 ^a	35000 ^a	105 261/82
23	-CH=N-NH-	Am	Am	0,085	0,8	11			17	14	3-4	387 ^b	47000 ^b	111 276/69
24		Im	Im	0,35	0,85	27			26	10	1-2	317 ^a	42400 ^a	111 276/97
25		Am	Am	0,50	2	4			3,5	16-17	1	390 ^b	16800 ^b	111 276/153
26	-O-(CH ₂) ₅ -O-	Am	Am	~0,3	~0,6	~2						261 ^b	33000 ^c	125 Pentamidin
27	-NH-CO-  -CO-NH-	Am	Am	0,3 - 0,6	~1	~4						274 ^c	10000 ^c	112 261/143



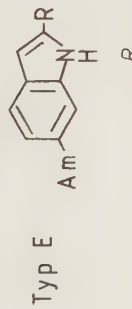
Nr	X	Y	Z	R ₁	R ₂	Spezifitäts- parameter α	Affinitätsparameter σ ⁺ M ⁺ x 10 ⁴					-K _{app} M ⁻¹ x 10 ⁵	n _{app}	λ _{max} nm	ε M ⁺ cm ⁻¹	Synth.-Ref. Code-Nr.	
							M.lul.	B.subst.	Cac-ur	% AT							
										25,5	55,5						
																	65,5
28	NH	NH	—	Im 6	Im 6	0,08	40	500		660	11-12	3-4	377	41200 ^c	113 288/48		
29	NH	O	—	Am 5	Am 5	0,20	3	13			12	8	2-3	349	34000 ^c	114 102/224	
30	NH	NH	-CH=CH-	Im 6	Im 6	fällt	DNA aus							415 ^b	42500 ^c	109 272/131	
31	O	O	-CH=CH-	Am 5	Am 5	0,20 ~ 0,30	2	10			7,1	8	2-3	376 ^b	37700 ^c	114 150/129	
32	O	O	-CH=CH-	Im 5	Im 5	0,45	anti-scatlard Verlauf										
33	S	S	-CH=CH-	Am 6	Am 5	0,31	13	46			85	23	1-2	367 ^b	25000 ^c	105 261/96	
34	NH	O	-CH=CH-	Am 6	Am 5	0,23 ^d 0,43	30 30	~70	~130		120 54	7 10	1-2 1-2	376 ^b	50900 ^c	115 278/133	
35	NH	O	-CH=CH-	Im 6	Im 5	0,35	15	27			19	7-8	1-2	381 ^b	40000 ^c	116 253/50	
36	NH	O	-CH=CH-	Am 5	Am 5	0,11 ^d	7		26		11	4-5	2-3	362 ^a	24500 ^a	116 253/152	
37	NH	O	-CH ₂ -CH ₂ -	Am 6	Am 6	0,61	4,6	8,8			7,1	9	1	296 ^a 323 ^a	10000 ^a	116 253/147	
38	NH	S	-CH=CH-	Am 6	Am 5	0,30	100	300			420	14-15	1-2	386 ^b	54400 ^c	115 287/90	

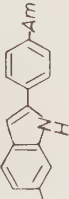
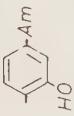


Nr	X	Y	Z	R ₁	R ₂	Spezifitäts- parameter α	Affinitätsparameter σ · M ¹ x 10 ⁴				K _{app} M ⁻¹ x 10 ⁵	n _{app}	n _{AT}	λ _{max} M ¹ ·cm ⁻¹	ε M ¹ ·cm ⁻¹	Synth.-Ref Code-Nr.
							M.lut.	B.subl.	C.ac-ur							
									% AT							
39	NH	CH		Im 6	Im 4'	0,17	10	56		54	9	2-3	336 ^a	3200 ^d	105 261/37	
40	NH	CH		Am 6	Am 4'	0,05	6	>60		42	6-7	4	327 ^b	2570 ^d	117 186/134	
41	NH	CH		Im 6	NH ₂ 4'	0,14	3	22		15	8-9	3	356 ^d	2500 ^d	110 287/95	
42	NH	CH		Am 6	Am 3'	0,06	2	36		26	8	4	329 ^b	26100 ^c	105 288/15	
43	NH	CH		Am 6	Am 4'	<0,11	4	55		50	8-9	>3	324 ^b	26000 ^d	113 288/59	
44	NH	CH		Am 5	Am 4'	0,17	1,2	85		7,2	8-9	2-3	275 ^a	38800 ^a	105 261/171	
45	NH	CH		Am 6	Am 4'	0,2 - 0,5	6-10	30-60		?	7-8	1-2	256 ^b 331 ^b	12000 ^c	105 288/4	
46	NH	CH		Am 6	Am 4'	0,16	1,3	7,3		7,1	11	2-3	255 ^a 333 ^a	10000 ^a	105 288/6	
47	NH	CH		Im 6	Im 4'	unregelmäßige	Bindung	wie bei	Nr. 45				377 ^c	25900 ^c	105 288/3	

Fortsetzung Typ D

Nr	X	Y	Z	R ₁	R ₂	Spezifitäts- parameter α	Affinitätsparameter			K _{app} M ¹ x 10 ⁵	n _{app}	λ_{max} nm	ϵ M ¹ .cm ¹	Synth.-Ref. Code-Nr
							σ M. lut. B	M ¹ x 10 ⁴ Subst. Cac-ur.	% AT					
48	NH	CH	-CH=CH-	Am 6	Am 4'	0,08 ^d 0,12	8	45	>80	30,5 ^d	6-7	372 ^a	37000 ^c	118 268/73
49	O	CH	-CH=CH-CH=CH-	Am 5	Am 4'	0,32	1,5	4		3,3	9	362 ^b	43000 ^c	107 283/54
50	O	CH	-CH=N-NH-	Am 5	Am 4'	0,14	1	7		9	17	387 ^b	57000 ^c	107 283/96
51	O	CH		Am 5	Am 4'	~0,47	~4	~9		?	?	383 ^b	25000 ^c	111 276/150
52	NH	N	-NH-	NH ₂ 5	Am 4'	0,55	0,45	0,85		1,2	14	322 ^a	27000 ^a	119 240/162



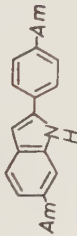
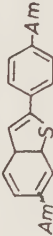
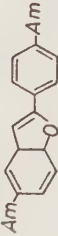
53				0,03	10	~300		310	12-13	5	385 ^b	39200 ^c	105 288/27
54				0,08	3	~30		20	7	3-4	358 ^b	24400 ^c	110 287/89
55	-Am			0,10	0,6	6		7,6	13	3	308 ^c	28000 ^c	105 261/115
56	-CH=CH-Am			0,17	2	10		32	11-12	2-3	337 ^a	13000 ^c	120 290/23

Vergleichssubstanzen

	Speziifitäts- parameter α	Affinitätsparameter				K_{app} $M^{-1} \times 10^5$	n_{app}	n_{AT}	λ nm	ϵ $M^{-1}cm^{-1}$
		$\frac{\epsilon}{M \cdot l.}$		$\% AT$	$\frac{10^4}{B. subl.}$					
Ethidium	1,67 <i>Lit.</i> ²⁹⁾ 1,23	15	10	555	4,5	3	<1	515 ^c	5900 ^c	
Samorin ^R	0,67	80	130		90	8-9	~1	378 ^b	29300 ^c	
H 33258	0,15 <i>Lit.</i> ²⁸⁾ 0,13	12	76		90	8-9	3	339 ^a 341 ^b	43000 ^c 43200 ^c	
Anthrycide ^R	1,1	2	1,8		0,75	4	<1	322 ^a	21200 ^c	

siehe auch Berenil^R (Nr. 20) und Pentamidin^R (Nr. 26).

Vergleichssubstanzen vom Typ A, getestet von W. Müller.⁶⁸⁾

	Spezifitäts- parameter α	Affinitätsparameter		
		σ	$M_k 10^4$	
		M. lut.	B. subl.	% AT
		25,5	55,5	
102/198 	0,06	4,1	67	
98/202 	0,41	2,2	5,4	
150/49 	0,35	1,1	3,1	

Literaturverzeichnis

- 1) M. Waring, Topics in Infectious Diseases Vol. 1, Symposium, Vienna, September 4-6, 1974. Edit. J. Drews und F.E. Hahn, Springer Verlag Wien - New York (1975)
- 2) E.F. Gale, E. Cundcliffe, P.E. Reynolds, M.H. Richmond und M.J. Waring, The Molecular Basis of Antibiotic Action, J. Wiley, London, New York, Sydney, Toronto (1972)
- 3) H. Kersten und W. Kersten, Inhibitors of Nucleic Acid Synthesis, in Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, 18, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1974)
- 4) E. Harbers, Nucleinsäuren, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1975)
- 5) Y.A. Surya, J.M. Rosenfeld, B.L. Hillcoat, Cancer Treat. Rep., 62(1), 23-9, (1978), ref. C.A. 88, 164101b (1978)
- 6) L.S. Lerman, J. Mol. Biol. 3, 18-30 (1961), ref. 2)3)
- 7) L.S. Lerman, J. Cell. Comp. Physiol. 64, Suppl. 1, 1-18, (1964), ref. 2)3)
- 8) W. Fuller und M.J. Waring, Ber. Bunsenges. Physik. Chem. 68, 805-808, (1964)
- 9) L.F. Lin und J.C. Wang, Biochim. Biophys. Acta 395(4), 405-412, (1975)
- 10) J.C. Wang, J. Mol. Biol. 47, 419-435, (1974)
- 11) W. Keller, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72(12), 4876-80, (1975)
- 12) M. Waring, J. Mol. Biol. 54, 247-279, (1970)
- 13) F.E. Hahn, R.C. O'Brian, J. Ciak, J.L. Allison, J.G. Ollnick, Milit. Med. 131, 1071, (1966)

- 14) H. Brockmann, Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe 18, Springer Verlag, Wien, (1960)
- 15) W. Müller und D.M. Crothers, J. Mol. Biol. 35, 251-290, (1968)
- 16) W. Kersten, H. Kersten und H.M. Rauen, Nature 187, 60, (1960), ref. 3)15)
- 17) H.M. Sobell, S.C. Jain, T.D. Sakore und C.E. Nordman, Nature New Biology 231, 200,(1971), ref. 2)
- 18) P. Chandra, F. Zunino, V.P. Gaur, A. Zacchara, M. Woltersdorf, G. Luoni und A. Götz, Febs Letters 28(1), 5-9, (1972)
- 19) E. Hirschberg, J.B. Weinstein, N. Gersten, E. Marnier, E. Finkelstein und R. Carchman, Cancer Res. 28, 601, (1968), ref. 12)
- 20) A.C. Sartorelli, A.T. Jannotti, B.A. Booth, F.H. Schneider, J.R. Bertino und D.G. Johns, Biochim. Biophys. Acta 103, 174, (1965), ref. 12)
- 21) M. Moskowitz, Nature 200, 335, (1963), ref. 12)
- 22) B. Weisblum, M.J. Davies, Bact. Rev. 32, 493, (1968), ref. 12)
- 23) R.M. Wartell, J.E. Larson und R.D. Wells, J. Biol. Chem. 249, 6719-6731, (1974)
- 24) G. Ehrhart und H. Ruschig, Arzneimittel 5, 327, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.,(1972)
- 25) G. Luck, C. Zimmer, K.-E. Reinert und F. Arcamone, Nucl. Acids Res. 4, 2655-2670, (1977)
- 26) B.A. Newton, Biochem. J. 105, 50 p., (1967)
- 27) B.A. Newton, R.W.F. LePage, Biochem. J. 105, 50 p., (1967)
- 28) W. Müller und F. Gautier, Eur. J. Biochem. 54, 385-394, (1975)
- 29) W. Müller und D.M. Crothers, Eur. J. Biochem. 54, 267-277, (1975)

- 30) W. Müller, H. Bünemann und N. Dattagupta, Eur. J. Biochem. 54, 279-291, (1975)
- 31) M.A. Rudzinska und K. Vickerman, "The Fine Structure", in Infectious Blood Diseases of Man and Animals, Vol.1, ed. D. Weinman und M. Ristic, Academic Press, New York, London, (1968)
- 32) B.A. Newton und J.K. Burnett, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 65, 243, (1971)
- 33) B.A. Newton, "Biochemical Approaches to the Taxonomy of Kinetoplastid Flagellates", in Biology of Kinetoplastida, Vol.1, ed. W.H.R. Lumsden und D.A. Evans, S. 405-434, Academic Press, London, New York, San Fransisco, (1976)
- 34) B.A. Newton und J.K. Burnett, "DNA of Kinetoplastidae: A Comparative Study", in Comparative Biochemistry of Parasites, ed. H. Van den Bossche, S. 185-198, Academic Press, New York, London, (1972)
- 35) C.L. Schildkraut, J. Marmur und P. Doty, J. Mol. Biol. 4, 430-443, (1962)
- 36) M. Steinert und S. v. Assel, "Kinetoplast DNA. Structure and Function", in Comparative Biochemistry of Parasites, ed. H. Van den Bossche, S. 159-166, Academic Press, New York, London, (1972)
- 37) E. Delain, Ch. Brack, A. Lacome und G. Rion, "Organization of the DNA in the Kinetoplast of Trypanosomatidae", in Comparative Biochemistry of Parasites, ed. H. Van den Bossche, S. 167-184, Academic Press, New York, London, (1972)
- 38) K. Vickermann und T.M. Preston, "Comparative Cell Biology of the Kinetoplastid Flagellates", in Biology of the Kinetoplastida, Vol.1, ed. W.H.R. Lumsden und D.A. Evans, S. 36-130, Academic Press, New York, London, San Fransisco, (1976)

- 39) M. Steinert und S. v. Assel, Biochem. Biophys. Res. Comm. 61(4), 1249-1255, (1974)
- 40) C. Brack und E. Delain, J. Cell Sci. 17, 287-306, (1975)
- 41) C.M. Kleisen, P. Borst und P.J. Weijers, Biochim. Biophys. Acta 390, 155-167, (1975)
- 42) C.M. Kleisen und P. Borst, Biochim. Biophys. Acta 407, 473-478, (1975)
- 43) C.M. Kleisen, P. Borst und P.J. Weijers, Eur. J. Biochem. 64, 141-151, (1976)
- 44) C.M. Kleisen, P.O. Weislogel, K. Fonck und P. Borst, Eur. J. Biochem. 64, 153-160, (1976)
- 45) A.H. Fairlamb, P.O. Weislogel, J.H.J. Hoeijmakers und P. Borst, J. Cell Biol. 76, 293-309, (1978)
- 46) R.F. Macadam und J. Williamson, Ann. Trop. Med. Paras. 68(2), 291-299, (1974)
- 47) W.E. Omerod und J.J. Shaw, British J. Pharmacol. 21, 259, (1963), ref. 46)
- 48) R.F. Macadam und J. Williamson, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 66, 897-904, (1972)
- 49) P. Ehrlich, "Über moderne Chemotherapie", Vortrag gehalten in der X. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, Frankfurt-am-Main, Akademische Verlagsgesellschaft b.H., Leipzig, (1908), ref. 48)
- 50) B.A. Newton, in Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships, ed. H. Van den Bossche, S. 459, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, (1976)
- 51) S.L. Hajduk, in Prog. Mol. Subcell. Biol. 6, S. 158, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1978)
- 52) W. Bauer und J. Vinograd, J. Mol. Biol. 33, 141-171, (1968)

- 53) R. Radloff, W. Bauer und J. Vinograd, Proc. Natl. Acad. Sci. Wash. 57, 1514-1521, (1967)
- 54) H.C. Renger, D.R. Wolstenholme, J. Cell Biol. 47, 689, (1970), ref. 51)
- 55) M. Steinert, Exp. Cell Res. 39, 69, (1965), ref. 44)
- 56) R.R. Meyer und M.V. Simpson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 238, (1969), ref. 48)
- 57) J. Williamson, Trop. Diss. Bull. 73, 531, (1976)
- 58) C. Brack und E. Delain, J. Cell Sci. 17, 287, (1975), ref. 57)
- 59) J.P. Richardson, J. Mol. Biol. 78, 703, (1973), ref. 57)
- 60) J. Williamson, in H.W. Mulligan (ed.), The African Trypanosomiases, G. Allen and Unwin Ltd., London, (1970)
- 61) J. Williamson und T.J. Scott-Finnigan, Antimicrob. Agents Chemother. 13, 735-744, (1978)
- 62) D.R. Makulu und T.P. Waalkes, J. Natl. Cancer Inst. 54, 305, (1975), 660, ref. 57)
- 63) J. Williamson und D.J. McLaren, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 660-661, (1978)
- 64) E. Fink und O. Dann, in Les moyens de lutte contre les trypanosomes et leurs vecteurs, Inst. Élev. Méd. Vét. pays trop., Actes du colloque, Paris 12-15 Mars, pp. 297-300, Maisons Alfort, Paris, (1974)
- 65) R.R. Tidwell, J.D. Geratz, O. Dann, G. Volz, D. Zeh und H. Loewe, J. Med. Chem. 21, 613-623, (1978)
- 66) D.H. Williamson und D.J. Fennell, in Methods in Cell Biology, ed. D. Prescott, S. 335-351, Academic Press, New York, (1975)
- 67) W. Müller, D.M. Crothers und M.J. Waring, Eur. J. Biochem. 39, 223-234, (1973)
- 68) W. Müller, Privatmitteilung

- 69) B.A. Newton, "Recent Studies on the Mechanism of Action of Berenil (Diminazene) and Related Compounds", in *Comparative Biochemistry of Parasites*, ed. H. Van den Bossche, S. 127-138, Academic Press, New York, London, (1972)
- 70) G.F. Fairclough und J.S. Fruton, *Biochemistry* 5, 673-683, (1966)
- 71) G. Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 660-672, (1949)
- 72) G. Powis, *J. Pharm. Pharmac.* 26, 113, (1974)
- 73) J. Judis, *J. Pharm. Sci.* 66, 803, (1977)
- 74) C.J. Bowner, W.E. Lindup, *J. Pharm. Sci.* 67, 1193, (1978)
- 75) M.J. Waring, *J. Mol. Biol.* 13, 269-282, (1965)
- 76) R.J. Sundberg, *The Chemistry of Indoles*, Academic Press, New York, London, (1970)
- 77) B. Mildner und P. Chandra, *Cell. Mol. Biol.*, (1979), im Druck
- 78) E. De Clercq, (1980), in Vorbereitung
- 79) P. Chandra und B. Mildner, *Cell. Mol. Biol.*, (1979), im Druck
- 80) A. Bierzynski, G. Boguta, K. Berens und K.L. Wierzychowski, *Studia biophysica* 67, 57-58, (1978)
- 81) E. Stephien, O. Dann, M. Fikus und K.L. Wierzychowski, *Studia biophysica* 67, 135-136, (1978)
- 82) J. Kania und T.G. Fanning, *Eur. J. Biochem.* 67, 367-371, (1976)
- 83) J. Kapuściński und B. Skoczylas, *Nucl. Acids Res.* 5, 3775-3799, (1978)
- 84) M.S. Lin, D.E. Comings und O.S. Alfi, *Chromosoma Berl.* 60, 15-25, (1977)
- 85) W.C. Galley und R.M. Purkey, *Proc. natl. Acad. Sci. (Wash.)* 69, 2198-2202, (1972), ref. 84)

- 86) S.A. Latt, Proc. natl. Acad. Sci. (Wash.) 70, 3395-3399, (1973), ref. 84)
- 87) J. Anne, E. De Clercq, H. Eyssen und O. Dann, Eur. J. Med. Chem., (1980) in Vorbereitung
- 88) NCI, Bethesda, USA, Privatmitteilung
- 89) O. Dann, Plenarvortrag auf der Tagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft am 28. September 1978 in Tübingen
- 90) J. Marmur, J. Mol. Biol. 3, 208, (1961)
- 91) G. Felsenfeld und S.Z. Hirschman, J. Mol. Biol. 13, 407, (1965), ref. 29)
- 92) A Manual of Methods for Analytical UZ, Beckman Instruments, (1973)
- 93) M. Mandel, C.L. Schildkraut und J. Marmur, Methods in Enzymology XII B [108] , 184, Academic Press, New York, (1968)
- 94) M. Beyeler, J. Solms, U.-W. Wiegand und H.G. Weder, Lebensm.-wiss. u. Technol. 7, 313-317, (1974)
- 95) H. Hirumi, J.J. Doyle, K. Hirumi, Science 196, 992-994, (1977)
- 96) R.W. Wilkes, in Techniques with Trypanosomes, 92, ed. W.H.R. Lumsden, W.J. Herbert und G.J.C. McNeillage, Churchill Livingstone, Edinburgh und London, (1973)
- 97) S.M. Lanham, Nature 218, 1273, (1968)
- 98) G. Harbaum-Neuhaus, Diss. in Vorbereitung
- 99) N. Blin und D.W. Stafford, Nucl. Acids Res. 3, 2303-2308, (1976)
- 100) W. Henning, Colora-Hauszeitschrift 76(3), S.1, (1975)
- 101) H. Bünemann und W. Müller, Nucl. Acids Res. 5, 1059, (1978)
- 102) H. Bünemann, pers. Mitteilung
- 103) O. Dann, G. Bergen, E. Demant und G. Volz, Liebigs Ann. Chem. 749, 68-89, (1971)

- 104) G. Volz, Laborjournal Nr.192
- 105) J. Ruff, Diss. Erlangen 1979
- 106) O. Dann, E. Hieke, H. Hahn, H.-H. Misere, G. Lürding und R. Rößler, Liebigs Ann. Chem. 734, 23-45, (1970)
- 107) H. Griebmeier, Diss. Erlangen 1979
- 108) W. Stich, Diss. in Vorbereitung
- 109) R. Schlee, Diss. in Vorbereitung
- 110) R. Holzheid, Diss. in Vorbereitung
- 111) W. Steuding, Laborjournal Nr.276
- 112) J. Ruff, Laborjournal Nr.261
- 113) J. Ruff, Laborjournal Nr.288
- 114) O. Dann, G. Volz, E. Demant, W. Pfeifer, G. Bergen H. Fick, E. Walkenhorst, Liebigs Ann. Chem. 1973, 1112, (1973)
- 115) P. Fleischmann, Diss. in Vorbereitung
- 116) H. Char, Diss. Erlangen 1978
- 117) O. Dann, H. Fick, B. Pietzner, E. Walkenhorst, R. Fernbach und D. Zeh, Liebigs Ann. Chem. 1975, 160-194, (1975)
- 118) H.-P. Wolff, Diss. Erlangen 1977
- 119) G. Schäfer, Diss. Erlangen 1977
- 120) G. Volz, Laborjournal Nr.290
- 121) Farbwerke Hoechst AG, private Mitteilung
- 122) J.M. Bafort, private Mitteilung
- 123) E. Fink, private Mitteilung
- 124) H. Jensch, Arzneim. Forsch. 5, 634-635, (1955)
- 125) J.N. Ashley, H.J. Barber, A.J. Ewins, G. Newberry und A.D.H. Self, J. Chem. Soc. (London) 1942, 103

Lebenslauf

Günter Minet

- 8.12.1946 Geboren in Münchberg/Ofr. als erstes von zwei Kindern; Vater: Heinz Minet, Apotheker, Mutter: Eva Minet, geb. Petrusch
- 1953-1957 Besuch der Volksschule in Baiersdorf
- 1957-1959 Besuch der Ohm-Oberrealschule in Erlangen
- 1959-1963 Besuch der Albrecht-Dürer-Oberrealschule in Nürnberg
- 1963-1968 Besuch des Adam-Kraft-Gymnasiums in Schwabach
- 23.7.1968 Abitur
- 1.10.1968- Apothekerpraktikant in der Mohren-Apotheke zu St.Lorenz in Nürnberg
- 30.9.1970 Pharmazeutische Vorprüfung in Nürnberg
- 17.9.1970 Studium der Pharmazie an der Universität Erlangen-Nürnberg
- Mai 1971- Febr. 1975 Erlangen-Nürnberg
- 16.5.1975 Pharmazeutische Staatsprüfung in Erlangen
- 10.7.1975 Approbation als Apotheker
- Ab 1.10.1975 Doktorand und wissenschaftliche Hilfskraft bei Professor Dr. O. Dann am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg
- Ab 1.3.1976 Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle
- 25.8.1978 Eheschließung mit Stud. pharm. Karin Sack aus Weißenstadt/Ofr.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197